T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE NANCY

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR-INGENIEUR

par

FERIDOUN H.S. DJAVADI
Ingénieur Agronome
Licencié ès Sciences

1ère Thèse. - Composition de la mycoflore des semences et verticilliose du cotonnier.

2ème Thèse. - Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 1968 *devant la Commission d'Examen*

MM. F. MANGENOT *Président*

J. GARNIER
P. CACHAN *Examinateurs*
R. LAGIERE

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE NANCY

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR-INGENIEUR

par

FERIDOUN H.S. **DJAVADI**
Ingénieur Agronome
Licencié ès Sciences

1ère Thèse. - Composition de la mycoflore des semences et verticilliose du cotonnier.

2ème Thèse. - Propositions données par la Faculté.

Soutenues le *devant la Commission d'Examen*

MM. F. MANGENOT *Président*

J. GARNIER
P. CACHAN *Examinateurs*
R. LAGIERE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Je suis heureux de trouver ici l'occasion d'exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur MANGENOT. Je lui suis reconnaissant pour l'intérêt constant qu'il a porté à ce travail, la confiance qu'il m'a toujours témoignée et la grande liberté qu'il m'a accordée dans mes recherches. Il m'a constamment dispensé ses conseils et a su me faire profiter de ses grandes connaissances par d'amicales et fructueuses conversations. Qu'il me permette de lui exprimer mon respectueux attachement.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur GARNIER, Monsieur le Professeur CACHAN et Monsieur LAGIERE qui ont bien voulu examiner ce travail et faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur GAY et Monsieur MAUGRAS, Maître-Assistant à la Faculté des Sciences de Nancy, qui m'ont permis de réaliser certaines expériences dans leur laboratoire et qui m'ont conseillé au cours de leur réalisation.

J'adresse mes remerciements aux Ingénieurs de l'Institut pour l'amélioration des plantules et semences du Ministère Iranien de l'Agriculture, qui m'ont fait parvenir aimablement les semences de cotonnier d'origine iranienne.

Je remercie également l'I.R.C.T. qui a bien voulu me communiquer quelques échantillons de semences.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur DELAVARENNE, Directeur de la bibliothèque du Service de Phytopathologie du Centre National de la Recherche Agronomique, dont l'accueil bienveillant m'a permis de compléter mes recherches bibliographiques.

J'exprime aussi mes remerciements à tous mes collègues du Laboratoire.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555023_0019

I N T R O D U C T I O N

Verticillium dahliae Kleb., parasite polyphage, induit le dépérissement de nombreuses plantes cultivées et en particulier le "wilt" du cotonnier dans de nombreuses aires de culture à travers le monde et surtout en Iran.

La transmission et la dissémination du Verticillium par les semences de cotonnier, sujet de nombreux travaux contradictoires, reste un problème non résolu.

En Iran, les fontes de semis du cotonnier, objet de quelques recherches fragmentaires, entraînent des pertes importantes dans les stands mais aucune étude de la mycoflore des semences n'avait été faite, à notre connaissance, afin de déterminer l'incidence de celle-ci au niveau des maladies des plantules.

Vu l'importance de ces deux problèmes, nous avons entrepris l'analyse de la mycoflore des semences de provenance iranienne. Cette étude nous a permis de démontrer que dans cette mycoflore un ou plusieurs champignons potentiellement parasites étaient toujours présents.

Entre le moment des semis et celui où la plantule devient autonome, il existe une phase critique pendant laquelle la semence joue un rôle important : elle pourvoit à la nutrition de la jeune plantule et peut lui transmettre les parasites qu'elle héberge. Mais du fait que dans la spermosphère

(VERONA 1958) la communauté formée par les champignons et bactéries parasites et saprophytes et la plantule naissante est soumise à des lois biologiques, la présence d'un parasite sur une semence, ou même dans le sol, ne signifie pas que la plantule sera obligatoirement endommagée. En effet, les conditions écologiques peuvent entraîner l'inhibition des parasites au profit des saprophytes ou favoriser la croissance de la plantule en limitant celle de l'agent pathogène. On sait que la modification des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques de l'environnement immédiat de la semence est due en partie aux substances exsudées par celle-ci, lorsqu'elle germe ; c'est un aspect de "l'effet graine" ("Seed-effect") (VERONA 1966). Il est toutefois difficile de situer la limite entre la spermosphère d'une semence en germination et la rhizosphère qui s'installe très vite autour de la racine en croissance. Les racines, dès les premiers jours, exsudent au niveau de leurs poils absorbants des composés élaborés dans les autres parties de la plante. Ces exsudats radicellaires peuvent déclencher la germination des organes de conservation de tel ou tel champignon et favoriser sa croissance mycélienne ou, au contraire, dans certains cas de plantes résistantes à une espèce de champignon pathogène donnée, inhiber la germination des conidies de celui-ci (BUXTON 1957).

Bien que le système radicellaire des cotonniers semble être un lieu important de la résistance de la plante vis-à-vis de Verticillium dahliae (NAZIROV et coll. (1960) ;

SOUKHATCHEVA (1960) ; MIRAKHMEDOV (1964) ; GARBER et coll. (1967)) l'influence des exsudats radicellaires sur le métabolisme du parasite n'a jamais été étudiée à notre connaissance.

Nous avons cherché à savoir si l'action exercée par les exsudats radicellaires du cotonnier sur le métabolisme du Verticillium était différente suivant l'espèce ou la variété de cotonnier considérée (résistante, tolérantes, sensible).

Nous avons étudié :

- l'action des exsudats radicellaires des plantules des différentes variétés de cotonnier sur la respiration du mycélium et des conidies du Verticillium ;

- l'action de ces exsudats sur la germination des conidies et la croissance linéaire du parasite.

Ayant observé une différence de comportement du Verticillium en présence des exsudats suivant leur origine, nous avons essayé de mettre en évidence quelques différences dans leur composition. Etant donné que les acides aminés et les composés phénoliques jouent un rôle important dans la résistance de la plante à la maladie (NAZIROV et coll. (1961) ; RUBIN et coll. (1963)) et exercent une certaine influence sur le métabolisme du Verticillium (POPOVA (1964) ; LE TOURNEAU et coll. (1957)), nous avons déterminé :

- la teneur et la composition en acides aminés des exsudats radicellaires et leur richesse en composés phénoliques.

Nous avons adopté le plan suivant :

PREMIERE PARTIE I - Conditions expérimentales et techniques.

DEUXIEME PARTIE II - Analyse de la mycoflore des semences de cotonniers.

TROISIEME PARTIE III - Influence des exsudats radicellaires des plantules de cotonniers sensible, tolérants et résistant sur certains aspects du métabolisme de Verticillium dahliae Kleb..

- Analyses de ces exsudats.

Les résultats seront discutés à la fin de chaque partie.

I - PREMIERE PARTIE

CONDITIONS EXPERIMENTALES ET TECHNIQUES

I-1 ANALYSE DE LA MYCOFLORE DES SEMENCES DE COTONNIER

Différentes techniques sont disponibles selon que l'on désire mettre en évidence la mycoflore externe des semences ou la présence de parasites installés dans les envoloppes, les cotylédons et l'embryon des semences de cotonnier.

I-1-1 Analyse de la mycoflore externe de quelques échantillons de semences de cotonnier de provenance Iranienne.

I-1-1-1 Origine du matériel utilisé

Espèces	Variétés	Lieu de récolte	Date de récolte
G. hirsutum	Coker 100 Wilt	VARAMINE	1964
G. hirsutum	Coker 100 Wilt	KORDKOUY	1965
G. hirsutum	Acala 349	KORDKOUY	1964
G. hirsutum	108-F	KORDKOUY	1965
G. herbaceum	Boumi-Aria	VARAMINE	1964

Les semences ne sont ni délintées, ni traitées. Elles sont stockées et manipulées aseptiquement dès réception.

I-1-1-2 Recherche des micromycétes par la culture sur milieux artificiels.

On peut caractériser la présence de nombreux micromycétes en provoquant leur développement : soit sur un milieu gélosé de composition connue (Méthode d'ULSTER : MUSKETT et MALONE (1941)), soit sur la semence même, placée en chambre humide sur un support inerte (sable - perlite...).

Les informations obtenues par l'analyse sanitaire n'ont qu'une valeur comparative si on choisit un seul milieu. Nous avons cherché à comparer plusieurs milieux riches ou pauvres en éléments nutritifs, afin de déterminer :

- les variations en valeur absolue des informations obtenues suivant la richesse du milieu ;
- s'il existe un milieu approprié permettant des lectures et des isolements aisés, et capable de mettre en évidence, le maximum de parasites potentiels.

I-1-1-2-1 Milieux utilisés

I-1-1-2-1-1 Milieu au Maltéa 1,5 %, au chloramphénicol 0,05 %, gélosé 1,5 %.

I-1-1-2-1-2 Milieu de CZAPEK

glucose, 20 g ; $NaNO_3$, 2 g ; KH_2PO_4, 1 g ; $MgSO_4$, 7 H_2O, 0,5 g; $FeSO_4$, 10 mg ; KCl, 0,5 g ; gélose, 15 g ; H_2O q.s.p. 1 000 ml.

I-1-1-2-1-3 Milieu à l'extrait de navet

Saccharose, 5 g ; suc obtenu par expression de navets, 200 ml ; extrait de levure, 1 g ; gélose, 15 g ; H_2O q.s.p. 1 000 ml.

I-1-1-2-1-4 Eau gélosée 1 %

I-1-1-2-1-5 Milieu à l'extrait de terre

1 kg de terre et 1 l. d'eau sont mélangés par agitation pendant 10 minutes. La suspension est d'abord portée à 80°C pendant une demi-heure puis autoclavée pendant 1 heure à 130°C en vue de floculer les argiles. Cette suspension est ensuite filtrée et la solution obtenue ajustée à 1 litre est mélangée à 1 litre d'eau gélosée 2 %, enfin l'ensemble est stérilisé pendant 20 minutes à 120° C.

I-1-1-2-1-6 Perlite humidifiée

10 g de perlite sont versés dans une boite de Pétri de 15 cm de diamètre ; l'ensemble est stérilisé à l'étuve pendant 4 heures à 180°C. On ajoute dans chaque boite 25 ml d'eau distillée stérile (50 % de la capacité de rétention des 10 g de perlite).

Dans ce cas, nous disposons 10 semences dans chaque boite de Pétri.

I-1-1-2-2 Notations

I-1-1-2-2-1 Méthodes utilisées

Dans tous les essais où nous utilisons un milieu gélosé, celui-ci est coulé dans des boites de Pétri de 10 cm de diamètre. On dispose aseptiquement à la surface du milieu 5 semences, à l'aide d'une pince, en les éloignant autant que possible les unes des autres. Pour chaque milieu et chaque échantillon, 100 semences sont analysées. L'incubation est faite à 27°C à l'obscurité.

Nous avons effectué 3 séries de notations successives:

- la première après 4 jours, cette notation est suivie de repiquage des colonies pour une caractérisation ultérieure
- la deuxième après 8 jours, accompagnée du dénombrement des colonies identifiables
- la troisième après 12-13 jours, accompagnée d'un deuxième dénombrement et de repiquages éventuels de nouvelles colonies.

Au début de nos expériences, nous avons examiné les boites de Pétri après 21 jours d'incubation, mais aucune information supplémentaire n'a pu être recueillie.

I-1-1-2-2-2 Résultats exprimés

I-1-1-2-2-2-1 Pourcentage de germination

Représente le nombre de semences qui germent normalement en boite de Pétri (nous opérons toujours avec des échantillons de 100 semences).

I-1-1-2-2-2-2 Pourcentage d'humidité des semences

Déterminé après 3 heures 30 de séchage à 130°C sur une balance d'humidité (CENCO).

Des temps de séchage plus longs (5-6 heures) n'entraînent aucune variation du poids.

I-1-1-2-2-2-3 Fréquence spécifique

Représente le nombre de fois qu'on rencontre la même espèce fongique sur un lot de 100 semences d'une variété sur un milieu donné.

I-1-1-2-2-2-4 Indice de pollution

Représente le nombre moyen d'espèces fongiques différentes présentes sur une semence. Pratiquement c'est la somme des fréquences spécifiques, calculées sur un lot de 100 semences, d'une variété, sur un milieu donné, divisée par 100.

I-1-1-3 Recherche des spores et sclérotes.

Verticillium dahliae, agent du "Wilt" du cotonnier sévit dans certaines régions de l'Iran ; n'ayant pu le mettre en évidence par la méthode de culture sur milieux artificiels (cf. 1-1-2) nous avons utilisé, pour détecter sa présence, deux techniques spéciales :

I-1-1-3-1 Méthode de dilution

Nous avons eu recours à la méthode préconisée par NADAKAVUKAREN et coll. (1959) pour l'isolement de Verticillium à partir des sols.

100 semences sont immergées dans 100 ml d'eau distillée stérile et agitées mécaniquement pendant 30 mn. Des parties aliquotes du surnageant (10 ml) sont introduites dans des fioles d'Erlenmeyer contenant 90 ml d'un milieu gélosé à 7,5 ‰, maintenu liquide à 42°C, renfermant 10 mg de streptomycine. Juste avant l'introduction du surnageant on y ajoute 0,5 ml d'éthanol absolu.

Le contenu de chaque fiole est réparti dans cinq boîtes de Pétri. Celles-ci sont incubées à l'obscurité à 27°C.

I-1-1-3-2 Observations microscopiques

Des lots de 50 semences d'un échantillon donné sont lavés 5 fois avec 20 ml d'eau distillée stérile. La première eau de lavage contient 1 % de Tween 20 facilitant le mouillage des fibres attachées à la surface des semences ("lint"). Les eaux de lavage sont collectées et mélangées.

20 ml de la solution obtenue sont filtrés sur une membrane Millipore (diamètre des pores : 0,45 µ). La membrane une fois sèche est découpée en carrés d'un centimètre de côté ; chaque carré est monté sur une lame porte-objet et traité avec quelques gouttes de bleu-coton au lactophénol. Les membranes Millipore deviennent transparentes au contact du colorant ce qui permet l'observation microscopique directe des spores et surtout des microsclérotes de Verticillium dahliae (EVANS et coll. 1966).

I-1-2 Analyse de la mycoflore interne des semences de cotonnier.

I-1-2-1 Origine du matériel utilisé

I-1-2-1-1 Semences d'origine iranienne

cf. I-1-1-1

I-1-2-1-2 Semences d'origines diverses

Espèces	Variétés	Lieu de récolte
G. barbadense	Mono	Togo-Dahomey
G. hirsutum	Saenz-Pena	Argentine
G. hirsutum	Reba B 50	Cambodge

I-1-2-2 Délintage et stérilisation superficielle des semences.

Différentes solutions peuvent être utilisées pour la stérilisation superficielle des semences : chlorure mercurique, hypochlorite de sodium, eau oxygénée, chlorure de chaux en solution aqueuse, éthanol,..., mais dans le cas du cotonnier il faut procéder à un délintage préliminaire afin d'éliminer les restes de fibres adhérant à la surface des téguments.

Les semences sont délintées par immersion dans l'acide sulfurique concentré, pendant 15 minutes, puis lavées à l'eau courante.

Après passage dans un mouillant (Tween 20 1°/₀₀, teepol 1%) la stérilisation superficielle se fait à l'aide d'une solution aqueuse de chlorure mercurique 2°/₀₀, pendant 15 minutes. Les semences sont ensuite lavées 4 fois à l'eau distillée stérile dans des conditions aseptiques puis transvasées dans une boite de Pétri stérile.

sêca dama uma boite de Petri stérile.

I-1-2-3 Recherche de la mycoflore interne totale par culture sur milieux artificiels.

I-1-2-3-1 Milieux utilisés

Nous utilisons les mêmes milieux qu'en I-1-1-2-1.

10 semences délintées stérilisées superficiellement sont disposées à la surface du milieu contenu dans les boites de Pétri. L'incubation est faite à 27°C à l'obscurité.

On utilise 100 semences pour chaque milieu et pour chaque échantillon. Nous effectuons les notations après 4, 8, 16 et 30 jours d'incubation.

Au cours de l'incubation de nombreuses plantules présentent des taches brunâtres sur leurs feuilles cotylédonaires ou des constrictions au niveau de leur coiffe radicelaire. Toutes les radicules ou cotylédons des plantules germées, ne montrant aucune colonie visible de champignon ou de bactéries, et présentant ces constrictions ou ces anomalies de coloration sont excisés et broyés. La suspension obtenue est mélangée dans une boite de Pétri avec du milieu, maltéa 1,5 %, gélosé 1,5 %, maintenu liquide à 42°C, afin de détecter une éventuelle présence de bactéries ou de champignons. Nous avons ainsi vérifié que ces anomalies ne sont pas dues à une attaque bactérienne ou fongique ; il est probable qu'elles proviennent des conditions de culture en boites de Pétri.

I-1-2-3-2 Critères de notation

Nous indiquerons : le pourcentage de germination, l'indice de pollution, les fréquences spécifiques et le pourcentage d'humidité comme définis en 1-1-2-2.

I-1-2-4 Recherche des parasites dans les téguments ou les amandes des semences.

La méthode précédente nous donne des indications sur la mycoflore parasite globale des semences, mais ne nous renseigne pas sur la région des semences dans laquelle le parasite est localisé.

100 semences de chaque échantillon sont délintées et stérilisées superficiellement (cf. I-1-2-2) puis coupées en 4 et les téguments sont séparés de l'amande.

Ces fragments sont répartis en totalité dans 2 boites de Pétri contenant du milieu maltéa 1,5 %; gélosé, 1,5 %. Toutes les opérations sont effectuées aseptiquement.

Les notations sont faites après 4, 8, 16 jours d'incubation à 27°C à l'obscurité.

Les souches isolées au cours de l'incubation sont repiquées sur tubes contenant un milieu gélosé approprié (cf. I-1-3).

I-1-3 Conservation et détermination des souches

I-1-3-1 Genre Fusarium

Les souches appartenant à ce genre sont conservées sur 2 tubes :

- le premier contient un milieu à la farine d'avoine : farine d'avoine 50 g ; sel marin 5 g ; gélose 15 g ; eau distillée q.s.p. 1 000 ml.

- le deuxième contient du milieu S (MESSIAEN et LAFON 1959) : $Ca(NO_3)_2$, 1 g ; KNO_3 0,25 g ; $MgSO_4$, $7H_2O$, 0,25 g ; K_2HPO_4, 0,125 g ; acide citrique, 0,05 g ; extrait de malt 1g ; saccharose 5 g ; gélose 25 g ; H_2O q.s.p. 1 000 ml.

La détermination des espèces est faite d'après la classification de SNYDER et HANSEN (SNYDER et HANSEN (1940 - 1941 - 1945) MESSIAEN (1959) SNYDER et TOUSSOUN (1965)) sur des isolements monospores obtenus suivant la méthode utilisée par HANSEN et SMITH (1932).

Suivant les indications de ZACHARIAH et coll. (1956) nous avons utilisé, comme milieu de détermination, le PDA (potato-dextrose-agar (Difco), 2 % ; gélosé 1 %).

L'incubation est faite à 27°C et à l'obscurité et la détermination 8 jours après l'ensemencement.

Certaines souches de Fusarium oxysporum et F. moniliforme ne forment des macroconidies qu'après exposition à la lumière et à des températures assez élevées (ZACHARIAH et coll. 1956). Nous avons exposé, tous les jours, ces souches 8 heures à la lumière du jour à 30-31°C. Cette méthode nous a donné entière satisfaction, cependant certains isolements de F. oxysporum ne forment leurs macroconidies qu'après 3 semaines de ce traitement.

L'observation des microconidies en chaîne de F. moniliforme (Gibberella fujikuroï)est facilitée par une

culture sur eau gélosée 1 %.

La formation des chlamydospores chez les souches appartenant à F. oxysporum et solani est induite par l'extrait de terre stérilisé à froid (Millipore 0,45 µ) mélangé à de l'eau gélosée maintenue liquide à 42°C (ALEXANDER et coll. 1966).

I-1-3-2 Genres Alternaria et Stemphylium

Les espèces de ces genres sont conservées et déterminées sur milieu maltéa 5 %; gélosé 1,5 % (JOLY 1964).

Afin d'éviter l'apparition de la phase stérile dans les cultures des Alternaria, ceux-ci sont déterminés au cours du premier mois qui suit leur isolement.

La détermination est faite au 8ème jour d'incubation à 27°C.

I-1-3-3 Genre Aspergillus

Les conditions et les milieux de cultures utilisés pour conserver et déterminer les espèces de ce genre sont ceux préconisés par RAPER et FENNELL (1965).

I-1-3-4 Autres genres

La conservation et la détermination des espèces sont faites soit sur milieu maltéa 1,5 % ; gélosé 1,5 %, soit sur milieu PDA 2 % gélosé 1 %.

I-2 CULTURE ASEPTIQUE DES COTONNIERS ET OBTENTION DES EXSUDATS RADICELLAIRES.

I-2-1 Origine du matériel utilisé.

Espèces	Variétés	Sensibilité au *V. dahliae*		Provenance	Date de récolte
G. hirsutum	Coker 100 Wilt	sensible	Amphidiploide n = 26	Varamine	1964
G. hirsutum	108 F	tolérant	Amphidiploide n = 26	Kordkouy	1964
G. hirsutum	Acala 349	tolérant	Amphidiploide n = 26	Kordkouy	1965
G.herbaceum	Boumi-Aria	résistant	Diploide n=13	Varamine	1964

Toutes les semences proviennent d'Iran

- Coker 100 Wilt, d'origine américaine (Upland), est la variété la plus utilisée en Iran, elle est très sensible au "Wilt" dû à *V. dahliae*
- Acala 349, d'origine américaine mais mal connue (ROUX 1962) s'est distinguée par sa grande tolérance au *V. dahliae* dans la région du Gorgan (N-N-E de l'Iran).
- 108-F, variété d'origine russe, montre une certaine tolérance au *V. dahliae*, mais elle s'est montrée moins tolérante que Acala 349 (CAUQUIL 1964).
- Boumi-Aria est une sélection à partir de la variété iranienne locale (Boumi) de *Gossypium herbaceum* race *persicum*.

Nous l'avons choisie pour sa résistance au Verticillium (CAUQUIL et RAHMANI (1964)).

I-2-2 Culture

Pour l'obtention des exsudats radicellaires, nous avons cultivé les plantules de cotonniers de 2 façons différentes :

- Plantules se développant sur sable dans des bocaux aseptiques où le niveau d'eau est variable.
- Plantules se développant sur sable dans des appareils de culture que nous avons mis au point [illegible] dans lesquels le niveau d'eau est constant.

I-2-2-1 Traitement préalable du sable

Le sable utilisé comme support de nos cultures est du sable extra-siliceux qui a subi les traitements suivants :

- lavage à l'eau courante sur tamis, 3 mm, 12 h.
- séjour de 48 h. dans un bain d'acide chlorhydrique concentré suivi d'un lavage de 2 h. à l'eau courante.
- séjour de 48 h. dans un bain d'acide sulfurique concentré suivi de lavage de 4 h. à l'eau courante.
- 3 lavages à l'eau distillée et contrôle du pH
- Séchage à l'étuve à 80-100° C

I-2-2-2 Préparation des milieux

I-2-2-2-1 Culture dans les bocaux

300 g. de sable lavé et 3 ml d'eau distillée sont introduits dans un bocal cylindrique (diamètre 10 cm, hauteur 10 cm), après stérilisation à l'autoclave 40 ml d'eau distillée

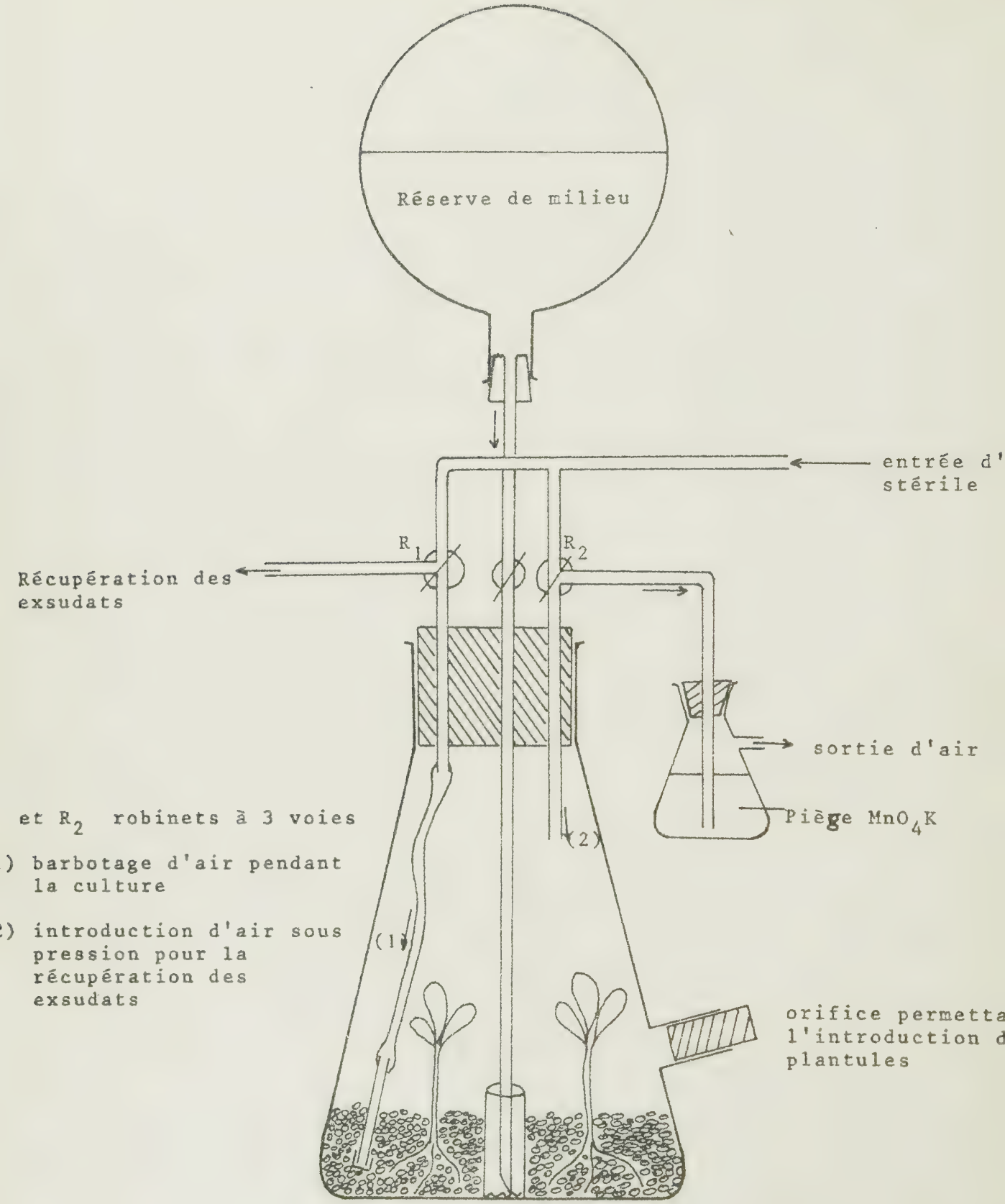


Figure 1 bis : Appareil de culture destiné à la production d'exsudats radicellaires stériles.

stérile y sont ajoutés.

I-2-2-2-2 Culture dans les appareils de culture

1,5 kg de sable lavé est introduit dans chaque appareil, l'ensemble est stérilisé à l'autoclave (120°C - 40 mn). Le niveau d'eau est réglé automatiquement de façon qu'il reste constant pendant toute la durée de la culture (volume d'eau = 100 ml).

I-2-2-3 Délintage et stérilisation superficielle des semences

Nous avons suivi la même technique qu'en I-1-2-2.

Cependant pour obtenir des plantules homogènes, nous avons éliminé toutes les semences de petite taille ou de densité inférieure à celle de l'eau.

I-2-2-4 Contrôle de la stérilité et de la germination des semences.

Les semences stérilisées superficiellement sont déposées dans des boites de Pétri (5 par boite) sur une mince couche d'eau gélosée à 1%. Les boites sont alors placées à l'étuve à 27°C pendant 48 h. puis examinées.

Toute boite contenant des semences contaminées et toute plantule présentant des anomalies de germination sont éliminées.

I-2-2-5 Elimination des téguments

GARBER et al. (1959) avaient signalé la présence d'inhibiteurs de croissance du V. albo-atrum dans les téguments des graines de cotonniers sensibles ou tolérants au Wilt. Mais SCHNATHORST (1962) a montré que ces substances inhibitrices

correspondent aux composés organo-mercuriques (cérésan) accumulés dans les téguments des semences au cours du traitement des plantes ou des semences de cotonnier.

Il est donc important de connaître l'histoire des traitements subis par les semences et leurs plantes-mères avant d'entreprendre une étude d'interaction hôte-parasite entre cotonnier et Verticillium. Les semences qui ont servi au cours de ces expériences n'avaient subi aucun traitement fongicide. Les téguments séparés de ces semences n'ont entraîné aucune zone d'inhibition de croissance de V. dahliae sur milieu PDA, 2 % ; gélosé, 1 %.

Malgré ces considérations, avant le transfert des plantules dans les bocaux ou les appareils de cultures, nous avons éliminé les téguments qui restent encore attachés aux cotylédons et ne sont rejetés qu'après des temps plus ou moins longs (SHROTH et al. (1966)), ce qui pourrait modifier les activités photosynthétiques et par conséquent la quantité de substances exsudées par chaque plantule.

I-2-2-6 Plantation

Les plantules sont piquées aseptiquement dans le sable, à raison de 20 plantules par bocal et 30 plantules par appareil de culture.

I-2-3 Conditions de culture

I-2-3-1 Lumière

Les appareils de culture et les bocaux sont placés à 35 cm des batteries de tubes (Sylvania - lumière du jour 40 W - 15 tubes/m). La période est réglée à 16 h. lumière,

8 h. obscurité. Signalons que l'intensité de la lumière peut agir sur l'excrétion des différentes substances à partir des racines (ROVIRA (1959-1965) ; MACURA (1966)).

I-2-3-2 Température

L'action de la température sur l'exsudation des semences et du système radicellaire a été signalée par ROVIRA (1959, 1965), HUSSAIN et coll.(1963), O'LEARY (1966), VANCURA (1967) dans le cas de cotonniers et d'autres plantes. SCHROTH et coll.(1966) dosant les hydrates de carbone et les substances ninhydrine positives des exsudats radicellaires du cotonnier observent aussi des variations dans l'exsudation en fonction de la température, mais ces variations sont peu importantes entre 15° et 33°C. Nous avons donc choisi comme limites de la température : minimum 15°C (obscurité) ; maximum 30° C (à la lumière).

I-2-3-3 Durée de la culture

Fixée à 10 jours, elle nous permet d'obtenir des exsudats radicellaires dans l'eau, sans que l'on soit obligé d'adjoindre un milieu salin pour le développement des plantes. En effet, les semences de cotonniers renferment assez de réserves pour assurer un développement normal de la plantule durant le stade cotylédonaire.

I-2-3-4 Contrôle de la stérilité

effectué au 6ème et 10ème jour de la culture, par examen microscopique et incubation sur milieu maltéa, 2% ; Gélosé 1,5%, de quelques gouttes du liquide de culture. La détermination

du pH, au 10ème jour étant une autre indication de la stérilité (cf. I-2-4) ; en effet toute contamination entraîne une variation importante du pH du liquide de culture.

I-2-4 Obtention des exsudats

Le liquide contenu dans chaque appareil ou bocal est recueilli séparément. Le sable est lavé avec 100 ml d'eau distillée dans le cas des bocaux et avec 400 ml d'eau distillée dans le cas des appareils de culture ; l'eau de lavage est ajoutée au liquide préalablement recueilli, après détermination du pH de ce dernier. Tout liquide de culture ayant un pH différent (à 0,1 unité près) du pH de référence, déterminé au début des expériences (tableau ci-dessous) est éliminé. Le lavage est effectué, à l'aide d'une pipette, plantule en place, afin de diminuer les risques de contamination par les exsudats foliaires.

Les plantules sont retirées par la suite et leur poids de matière sèche déterminé (tableau ci-dessous).

	Coker 100 W	Acala 349	108 F	Boumi-aria
pH des exsudats	4,6	6	5	4,8
Poids moyen de matière-sèche d'une plantule en mg	65	66	60	40,5

Les exsudats sont conservés à -20° C jusqu'à lecture des contrôles de stérilité (4-6 jours). Les exsudats de la même variété sont alors mélangés, congelés et concentrés sous vide à basse température.

Nous récoltons environ 30 ml de liquide dans chaque bocal, soit 1,5 ml par plantule. Le matériel exsudé, durant 10 jours, par une plantule dans de l'eau ramenée à 1,5 ml, sera fixé conventionnellement comme l'unité de concentration (conc. = 1) des exsudats radicellaires.

Cette concentration étant établie, l'on peut concentrer à volonté les exsudats suivant les besoins expérimentaux, en vue d'obtenir après mélange avec d'autres solutions ou suspensions des concentrations finales = 1.

I-2-5 Stérilisation

Après concentration les exsudats sont stérilisés à froid (filtre Millipore - 0,45 µ)

I-2-6 Conservation

A - 20°C ; la durée maximum de conservation ne dépasse pas 3 mois.

I-3 ACTION DES EXSUDATS RADICELLAIRES DE COTONNIERS, SENSIBLE, TOLERANTS ET RESISTANT SUR LA VITESSE DE RESPIRATION DU MYCELIUM ET DES CONIDIES DE Verticillium dahliae Kleb.

I-3-1 Préparation d'une suspension de mycelium ou de conidies

I-3-1-1 Souche utilisée

C'est une souche de Verticillium dahliae Kleb. isolée du cotonnier en Iran par l'I.R.C.T., en 1964 ; elle forme de nombreux microsclérotes sur milieu gélosé. Remarquons que cette souche correspond au "Wild Type" ou "microsclerotial form" du Verticillium albo-atrum Rke et Berth. des auteurs américains.

La souche est conservée par repiquage soit sur milieu PDA, 2 % ; gélosé, 1 %, soit sur caryopses d'avoine stérilisés.

La souche est enregistrée sous le numéro Mo 476 à la Mycothèque de l'E.N.S.A. de Grignon.[x]

I-3-1-2 Milieu de culture

C'est un milieu synthétique liquide fortement tamponné (phosphate 0,19 M). Le pH = 6,3 ne varie pas pendant la durée de culture.

Ce milieu est composé de : glucose, 25g ; NH_4NO_3, 2,299g ; $MgSO_4,7H_2O$, 0,5g ; $Fe(NO_3)_3,9H_2O$, 1,45mg ; $ZnSO_4,7H_2O$, 0,88mg ; $MnSO_4,4H_2O$, 0,41mg ; H_2KPO_4, 18,146g ; HK_2PO_4, 11,612g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml.

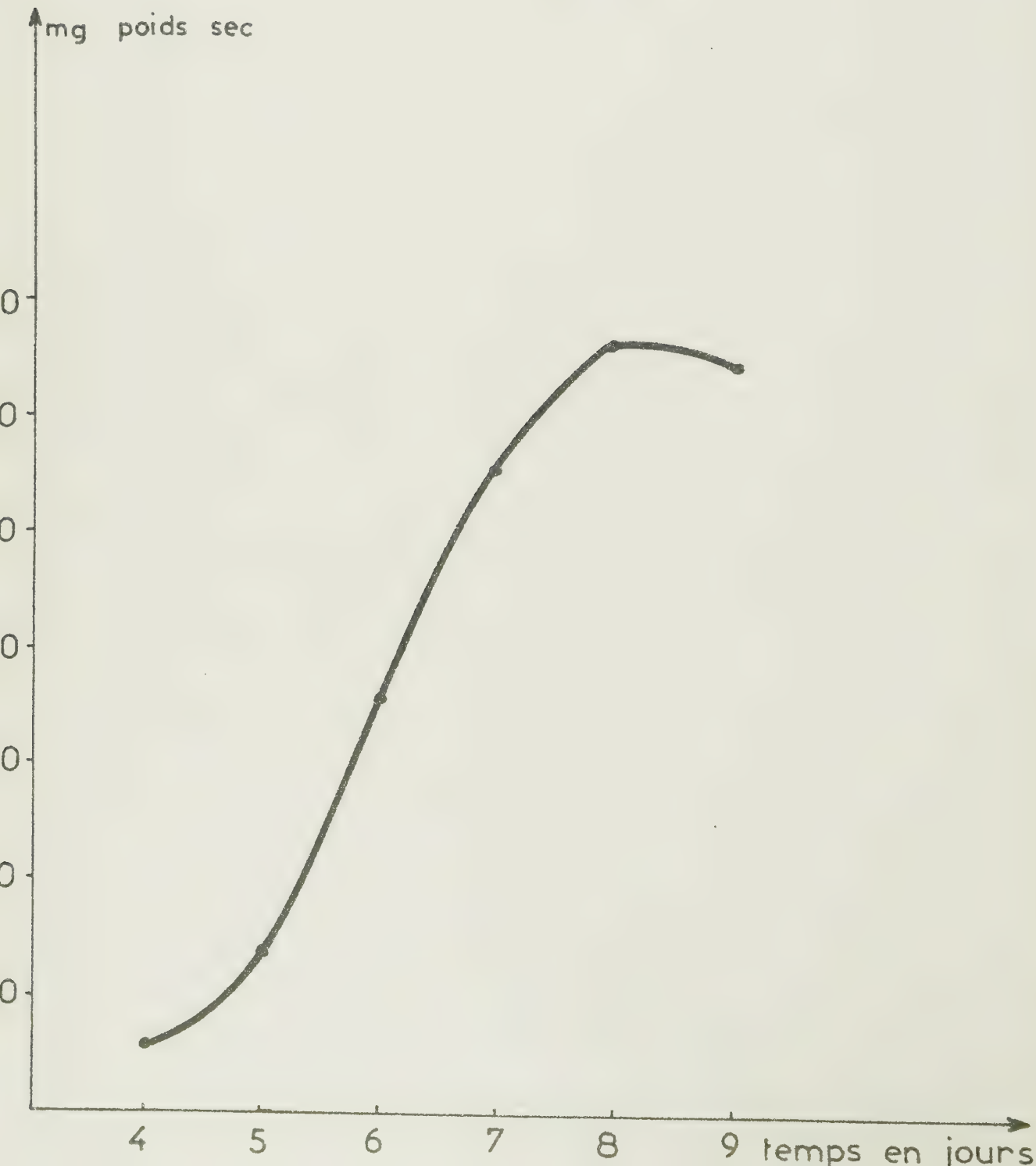
Le choix du glucose comme source de carbone, et du nitrate d'ammonium comme source d'azote se justifie par les travaux de MALCA et coll.(1966).

---

x Nous remercions Monsieur le Professeur MASSENOT qui nous a aimablement communiqué cette souche.

Figure I

Courbe de croissance de V. dahliae sur milieu synthétique liquide.



Le milieu fraîchement préparé est stérilisé à l'aide d'un filtre Millipore (0,45 µ) et réparti dans des fioles d'Erlenmeyer de 150 ml préalablement stérilisées, à raison de 50 ml par fiole.

I-3-1-3 Culture

Les fioles sont ensemencées à l'aide d'une culture de 21 jours, incubées à 27°C à l'obscurité et agitées 2 fois par jour pendant 1 minute. La durée de culture est de 8 jours. Les microsclérotes ne se forment pas sur ce milieu, même en culture prolongée.

I-3-1-4 Courbe de croissance

Nous avons estimé la croissance de notre souche de Verticillium sur le milieu (cf. I-3-1-2) par la détermination du poids sec de la culture.

Des fioles d'Erlenmeyers sont préparées, ensemencées et incubées comme décrit. Chaque jour, du 4ème jusqu'au 9ème, 4 fioles sont prélevées et leur contenu recueilli séparément sur entonnoirs de Buchner munis d'un papier filtre. Le champignon est alors lavé avec 50 ml d'eau distillée et son poids sec déterminé.

La figure I montre la courbe de croissance de notre souche de Verticillium dans les conditions décrites.

I-3-1-5 Obtention de la suspension de mycelium ou de conidies

Le contenu des fioles de culture est transvasé aseptiquement dans le tube stérile d'un homogénéiseur (Lourdes) et agité vigoureusement pendant 15 secondes à la vitesse moyenne.

Cette opération entraîne le détachement des conidies agglomérées dans les têtes muqueuses au sommet des conidiophores.
La suspension obtenue est centrifugée aseptiquement 3 min. à 300 g. Le mycelium forme alors le culot de centrifugation tandis que la majorité des conidies reste dans le surnageant (BECHTOL et coll. 1966).

Le mycelium est repris, après élimination du surnageant, avec une solution tampon phosphate 0,12 M (pH = 6,3) stérile et lavé 2 fois suivant la même technique.

Pour l'obtention de la suspension de conidies, le surnageant de la première centrifugation est centrifugé 10 min. à 2000 g. Les conidies formant le culot de centrifugation sont reprises avec une solution de tampon phosphate 0,12 M stérile et lavées 2 fois suivant la même technique.

Nous récoltons environ 45 mg de conidies et 85 mg de mycelium en poids sec par fiole de culture.

Pour les besoins de nos expériences, les conidies provenant de chaque fiole de culture sont mises en suspension dans 9 ml de solution tampon phosphate 0,12 M et le mycelium dans 25 ml du même tampon.

I-3-2 Mesure de la vitesse de respiration du mycelium et des conidies en présence des exsudats.

I-3-2-1 Préincubation du mycelium ou des conidies en présence des exsudats.

Un certain volume d'exsudat (concentration = 2) de chaque variété est ajouté à un volume égal de suspension de

mycelium ou de conidies dans une fiole d'Erlenmeyer stérile. La fiole est ensuite soumise à agitation (amplitude d'oscillation : 3 cm ; fréquence d'oscillation : 110/min.) dans un bain-marie à 27°C.

Les témoins sans exsudat sont constitués par le mélange à volume égal de la suspension de mycelium ou de conidies et d'eau distillée stérile.

Des témoins d'exsudats sans mycelium ou conidies servent de test de stérilité.

I-3-2-2 Technique manométrique

Les vitesses de consommation d'oxygène (QO_2 = µl d'O_2 consommé par heure/mg poids sec) ont été déterminées en atmosphère d'air, par la technique manométrique différentielle (Respiromètre Gilson)(UMBREIT et coll. (1959)).

Les mesures sont faites à 27°C dans les mêmes conditions d'agitation que ci-dessus.

Chaque fiole à réaction (de Warburg) contient :

- Capacité principale : 2 ml du mélange prélevé périodiquement (toutes les 90 min.) dans les fioles de préincubation.
- Ampoule latérale : le substrat : 0,2 ml d'une solution de glucose à 2 %
- Cavité centrale : 0,2 ml de KOH 20 % dans laquelle plonge un rectangle de papier Whatman n°1, plissé.

Après l'équilibre de la température, le substrat est renversé dans la capacité principale ; c'est le temps zéro de l'expérience.

Nous utilisons des quantités de mycelium de l'ordre de 3,4 mg et des quantités de conidies de l'ordre de 5mg en poids sec. Dans ces conditions, la diffusion des gaz (CO_2 et O_2) n'est pas facteur limitant des échanges gazeux.

I-4 SPECTRE HEMATINIQUE (- 190°C) DU Verticillium dahliae

Le spectre est fait sur le champignon cultivé :

- soit sur milieu synthétique liquide (cf. I-3-1-2) dilué 2 fois à l'eau distillée stérile.
- soit sur le même milieu additionné d'exsudat à la concentration finale = 1.

Les exsudats utilisés sont ceux de la variété Boumi-aria et Coker 100 Wilt.

La technique utilisée est celle décrite par CHAIX et PETIT (1956). Le spectrographe est du type A de la Société Générale d'Optique.

Sur une même plaque (Ilford), on photographie dans les mêmes conditions la préparation, pâte obtenue par sédimentation de cultures de Verticillium 5 min. à 2.000g, plongée dans l'azote liquide et des écrans neutres (Wratten Kodak) de densité optique connue.

Le noircissement des spectres photographiés est traduit en courbes grâce au microphotomètre de Moll couplé à un

potentiomètre enregistreur Philips. La courbe de noircissement de la préparation est ensuite traduite en courbe de densité en comparant pour chaque longueur d'onde le noircissement du spectre avec celui des écrans.

I-5 CROISSANCE LINEAIRE DU MYCELIUM DE V. dahliae SUR MILIEU GELOSE EN PRESENCE DES EXSUDATS.

La croissance linéaire du mycélium est appréciée dans des tubes à essai contenant un milieu gélosé et portant un barrage à 4 cm de l'ouverture (JOLY 1964).

I-5-1 Préparation du milieu

2 ml de milieu, PDA 4% ; gélosé, 2%, sont introduits dans chaque tube. L'ensemble stérilisé à l'autoclave reçoit avant solidification de la gélose 2 ml d'exsudats (concentration = 2).

Après homogénéisation, les tubes sont couchés à plat pour permettre l'obtention d'une couche de substrat plane et d'épaisseur égale.

Des tubes dans lesquels l'exsudat est remplacé par de l'eau distillée servent de témoin.

I-5-2 Préparation de l'innoculum

Le champignon est cultivé pendant 21 jours à 27°C, sur boîte de Pétri contenant du PDA, 2% ; gélosé, 1%. Des disques de gélose de 4mm de diamètre, sont prélevés sur le front de croissance et servent à ensemencer les tubes. Les ouvertures des tubes sont munies après ensemencement d'une couche de

parafilm, permettant une moindre évaporation du milieu et une lecture prolongée.

Les tubes incubés à 27°C sont placés inclinés, l'ouverture vers le bas afin d'éviter les inoculations secondaires dues à la chute des conidies formées sur le milieu.

La longueur des colonies est mesurée tous les 4-5 jours.

I-6 GERMINATION DES CONIDIES DU V. dahliae EN PRESENCE DES EXSUDATS RADICELLAIRES.

I-6-1 Obtention d'une suspension de conidies.

Une suspension de conidies est obtenue par la technique décrite (cf. I-3-1-5). La suspension amenée à 50 ml avec du tampon phosphate 0,12 M est déposée au réfrigérateur, à 4°C pendant 4 h., afin que les conidies subissent une période d'inanition (BECHTOL et coll.1966).Après cette période la suspension est centrifugée aseptiquement 10 min. à 2.000 g. Les conidies sont reprises avec 50 ml de tampon phosphate 0,12 M et la suspension est ramenée ensuite à 10^5 conidies/ml après comptage hématimétrique, en utilisant le même tampon.

La suspension est gardée dans un bain de glace jusqu'à son utilisation.

I-6-2 Technique utilisée.

Pour l'étude de l'influence des exsudats radicellaires de cotonniers sur la germination des conidies, nous avons utilisé la technique classique de germination sur lames porte-objets en chambre humide.

Des boîtes de Pétri munies de tubes de verre en V sont stérilisées. 5 ml d'eau stérile sont ajoutés dans chaque boîte et une lame porte-objets est déposée sur le support en V.

1 goutte (= 0,05 ml) de la suspension titrée de conidies et une goutte des différents exsudats (concentration = 2) sont déposées côte à côte sur la lame puis mélangées,

Le témoin est constitué d'une goutte de suspension de conidies et d'une goutte d'eau distillée stérile, ceci afin que la concentration en phosphate soit la même sur toute les lames (concentration finale = 0,06 M).

L'incubation est faite à 27° C à l'obscurité.

Pour chacune des durées d'incubation (6 h., 18 h., 24 h.) 4 lames sont utilisées. La germination est arrêtée par dépôt d'une goutte de bleu coton à l'eau sur chaque lame.

2 comptages, intéressant chacun 100 conidies, sont effectués sur chaque lame.

I-7 QUELQUES ANALYSES DES EXSUDATS RADICELLAIRES DE COTONNIERS.

I-7-1 Origine du matériel et obtention des exsudats.

cf. I-2

I-7-2 Analyse des acides aminés.

Nous avons utilisé la technique bidimensionnelle de chromatographie sur couche mince proposée par MAUGRAS et coll. (1966) que nous rappelons ici :

I-7-2-1 Chromatographie échangeuse d'ions.

Les acides aminés totaux sont obtenus par passage des exsudats sur une colonne (Dowex 50 x 8,100-200-mesh) de 40 cm de longueur et de 1 cm de diamètre.

I-7-2-1-1 Activation de la résine et confection de la colonne.

La résine est traitée, par agitation magnétique dans un becher, successivement au : HCl, 4N ; NaOH, 4N ; HCl, 2N ; NaOH, 2N ; HCl, N ; NaOH, N et HCl, N ; puis lavée à l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un pH voisin de la neutralité.

Les solutions sont éliminées après décantation de la résine. Chaque traitement dure environ 10 minutes.

La suspension de résine est alors versée dans la colonne, après décantation, le surnageant est éliminé de manière que la résine ne soit jamais au contact de l'air.

I-7-2-1-2 Chromatographie

Sur la colonne ainsi préparée, on introduit 10 ml de la solution d'exsudats (concentration = 2). On laisse écouler la colonne et on lave avec 75 ml d'eau distillée (écoulement 30 gouttes/min.). Ce lavage élimine les substances neutres et les acides libres.

On poursuit l'élution avec 75 ml d'ammoniaque N. Le passage de l'ammoniaque sur la colonne peut être suivi par le changement de couleur de la résine au contact de la solution basique.

On recueille par fraction de 25 ml. Les acides aminés sont contenus dans les 25 premiers millilitres d'éluant constitué par l'ammoniaque.

La régénération de la résine est faite par la technique décrite pour l'activation.

La fraction d'acides aminés recueillie est concentrée sous vide à 45°C, jusqu'à l'obtention d'un résidu huileux. Celui-ci est repris par 1 ml d'eau distillée et ramené à pH ≃ 1 avec HCl, N ; sinon aucune migration n'est observée sur les plaques.

I-7-2-2 Chromatographie sur couche mince.

I-7-2-2-1 Confection des chromatoplaques.

On pulvérise sur 10 plaques, soigneusement lavées, séchées et dégraissées, une suspension homogène constituée de 16g de DEAE-cellulose[x], 4g de poudre de cellulose[xx] dans 180ml d'eau. La suspension est obtenue à l'aide d'un homogénéiseur (type "mixer").

Le séchage est fait à la température ordinaire (une nuit).

---

x MN cellulose pulver 300 G/DEAE (Diethylaminoéthyl) Macherey et Nagel C°

xxMN cellulose pulver 300 Macherey et Nagel C°

I-7-2-2-2 Lavage des chromatoplaques.

Il consiste en une "chromatographie à blanc" faite avec une solution d'acide acétique à 20 % dans l'éthanol (30min.) Les chromatoplaques sont séchées à l'air (30 min.).

I-7-2-2-3 Dépôts du mélange d'acides aminés à analyser.

On dépose 10 µl de la solution à analyser à 1,5 cm des bords dans un angle de la plaque.

I-7-2-2-4 Première dimension

Les chromatoplaques sont placées dans une cuve contenant le mélange éluant : pyridine - eau (80 - 20 V/V). Le volume d'éluant est réglé de façon que les plaques soient immergées de 0,6 à 0,8 cm dans la solution. L'élution est effectuée à 30°C à l'étuve. Le front atteint une hauteur de 19 cm au bout de 1 h 20 min.

Les plaques sont séchées à l'air libre pendant 30 min.

I-7-2-2-5 Deuxième dimension.

Les chromatoplaques sont mises à migrer dans la direction perpendiculaire à la première dimension, dans le mélange éluant : méthanol - pyridine - acide acétique - eau (80 - 4 - 1 - 20 V/V). La migration dure 1 h à 30°C.

Le séchage est fait à l'air libre pendant 30 min.

I-7-2-2-6 Révélation.

On pulvérise sur la plaque une solution de ninhydrine (50 mg dans 35 ml d'éthanol) à laquelle on ajoute 10,5 ml d'acide acétique et 1,45 ml de γ collidine (triméthyl 2-4-6 pyridine) juste au moment de la pulvérisation.

Les plaques sont ensuite placées à l'étuve à 110°C pendant le temps nécessaire à l'apparition des taches.

La caractérisation des acides aminés de l'échantillon est assez aisée à l'aide de témoins internes d'acides aminés de commerce. Nous déposons en même temps que la solution à analyser, 2,5 µl d'une solution contenant 1mg/ml d'acide aminé connu.

I-7-3 Analyse des composés phénoliques.

I-7-3-1 Chromatographie des composés phénoliques.

I-7-3-1-1 Extraction préliminaire des matières grasses.

Les matières grasses exsudées par les racines des plantules empêchent ou gênent la migration des composés phénoliques, elles sont éliminées par extraction continue (24 h.) à l'éther de pétrole.

I-7-3-1-2 Extraction des composés phénoliques.

Ils sont extraits, en continu pendant 48 h., avec l'acétate d'éthyle, à partir du résidu aqueux provenant de la première extraction. L'acétate d'éthyle est éliminé à l'évaporateur continu, à 40°C, et les composés phénoliques sont repris à l'éthanol et ramenés à pH 2 à l'aide du HCl, N.

Nous opérons de façon à obtenir des concentrations finales correspondant à la concentration 100 des exsudats.

Signalons que des extractions à l'éther éthylique ne nous ont pas permis d'extraire les composés phénoliques en quantité détectable.

Les résidus aqueux sont concentrés et nous vérifions, par chromatographie, dans quelle mesure l'extraction des

composés phénoliques est complète.

I-7-3-1-3 Déposes.

Réalisées avec 100 µl des extraits, sur papier Whatman n°1, nous opérons par chromatographie en phase ascendante.

I-7-3-1-4 Solvants et temps de migration.

Butanol - acide acétique - eau (4 - 1 - 5 V/V) solvant biphasique. Durée de migration 16 h.

Butanol - acide acétique - eau (8 - 2 - 2 V/V) solvant monophasique. Durée de migration 16 h.

Butanol saturé d'ammoniaque 4N, durée de migration 16 h.

Les solvants sont introduits dans les cuves 1 h. avant le papier. La migration s'effectue à 23°C.

Pour les essais préliminaires, nous utilisons comme solvant l'acide acétique à 2% dans l'eau (durée de migration 3 h.).

I-7-3-1-5 Révélations.

Après séchage sous courant d'air froid, les chromatogrammes sont observés à la lumière naturelle puis à l'U.V.

Les réactifs utilisés en pulvérisation sont (LEDERER et coll. 1959) :

- p-nitro-aniline diazotée : Composé d'un mélange de 25 ml de p-nitro-aniline 0,3 %, dans l'acide chlorhydrique à 8 % avec 1,5 ml d'une solution de nitrite de soude à 5 %. Les 2 solutions sont mélangées juste avant l'emploi.

L'application de cette solution sur le chromatogramme est suivie d'une pulvérisation avec du carbonate de sodium à 15 % dans l'eau.

- Acide sulfanilique diazoté : même méthode de préparation que la p-nitro-aniline diazotée en remplaçant la p-nitro-aniline par l'acide sulfanilique.

- Chlorure ferrique à 0,2 % dans l'eau

- Ferricyanure de potassium, solution aqueuse à 1 %.

I-7-3-2 Recherche du gossypol dans les exsudats.

I-7-3-2-1 Préparation et extraction du gossypol à partir des semences.

Nous avons extrait le gossypol à partir des semences de cotonnier d'après la technique proposée par SMITH (1960) que nous rappelons très brièvement :

I-7-3-2-1-1 Extraction du gossypol et précipitation du dianilinogossypol.

Le gossypol extrait, à l'éthoxyéthane (éther éthylique) de la farine de semences de cotonniers est précipité sous forme de dianilinogossypol par adjonction d'aniline.

Signalons que la précipitation du dianilinogossypol n'a pu être obtenue qu'en présence d'éthoxyéthane.

I-7-3-2-1-2 Hydrolyse du dianilinogossypol et cristallisation de gossypol - acide acétique.

Le dianilinogossypol est hydrolysé puis transformé en gossypol - acide acétique en présence d'éthoxyéthane, d'acide

sulfurique et d'acide acétique glacial.

Le précipité de gossypol-acide acétique est purifié par redissolution dans l'eau et l'éthoxyéthane et recristallisation, à l'aide d'acide acétique, successives.

I-7-3-2-1-3 Extraction du gossypol à partir de gossypol-acide acétique.

Le gossypol-acide acétique dissous dans l'éthoxyéthane est transformé en gossypol par adjonction d'eau glacée. Les cristaux de gossypol sont alors lavés, séchés et conservés à 4°C dans un récipient clos.

Les coefficients d'extinction du spectre d'absorption du gossypol sont donnés par SMITH (1960).

I-7-3-2-2 Essais d'extraction et de chromatographie du gossypol à partir des exsudats.

I-7-3-2-2-1 Extraction du gossypol.

L'extraction du gossypol à partir des exsudats est faite suivant la technique de SCHRAMM et coll. (1958).

100 ml d'exsudats (concentration I) sont évaporés à sec à basse température, dissous dans environ 100 ml d'heptane et extraits 2 fois avec 25 ml d'un mélange de diméthyl-formamide -eau (2 - 1 V/V). Les couches denses sont mélangées et diluées avec 150 ml d'eau distillée. Ce mélange est traité 3 fois avec 50 ml d'une solution heptane - chloroforme (9 - 1 V/V). On prélève la couche légère après centrifugation. Le mélange des couches légères est séché en exsiccateur en présence de sulfate de sodium anhydre, filtré et concentré à 40°C jusqu'à 1ml.

La solution ainsi obtenue est conservée au réfrigérateur.

Une extraction semblable est effectuée sur une solution d'heptane contenant 1mg/1 de gossypol pur.

I-7-3-2-2-2 Chromatographie.

En phase ascendante sur papier Whatman 3 MM.

Deux rectangles de papier Whatman n°1 sont posés contre les parois de la cuve et mouillés avec le mélange éluant, afin de permettre une parfaite saturation de l'atmosphère de la cuve.

- Solvant : Heptane-Chloroforme-acide acétique (80-10-5 V/V)
- Déposes : 100 et 500 µl des extraits à partir des exsudats
  10 µl d'extrait à partir de la solution de 1mg/1 de gossypol pur.

Le temps de migration est de 1 h 30 min. Le chromatogramme est séché sous courant d'air froid puis révélé par pulvérisation.

La révélation est faite avec 2 g de phloroglucinol dissous dans 10 ml d'éthanol et 5 ml de HCl concentré.
Le révélateur est préparé juste avant l'emploi.

DEUXIEME PARTIE

II - ANALYSE DE LA MYCOFLORE DES SEMENCES DE COTONNIER.

Les semences de cotonnier d'origine iranienne et dont nous avons analysé la mycoflore proviennent :

- soit de variétés couramment cultivées : coker 100 Wilt, occupait, en 1961, 87,4 % des surfaces cultivées en coton ; Boumi-aria, 3, 6 % (REEB (1963)).

- soit de variétés en cours d'expérimentation : Acala 349, 108 F, possèdent des caractéristiques de résistance au Verticillium dahliae et pourront remplacer Coker 100 Wilt dans certaines régions fortement infectées par le parasite.

Les semences d'autres origines (Mono, Saenz Pena, Reba B50) se sont avérées intéressantes quant à leur mycoflore interne et seront comparées avec les semences iraniennes.

Les tableaux I à V rapportent la fréquence des différentes espèces dans la mycoflore externe des semences.

Le tableau VI rapporte la fréquence des parasites dans la mycoflore interne des semences.

Le tableau VII montre la répartition de la mycoflore interne dans les téguments et les amandes des semences.

Nous exposerons d'abord les faits que l'on peut dégager de ces expériences quant à l'influence du milieu utilisé sur la fréquence spécifique des champignons isolés, puis nous discuterons de l'importance des différents genres et espèces et de leurs potentialités parasitaires.

TABLEAU I

MYCOFLORE EXTERNE DES SEMENCES DE COTONNIER VARIETE COKER 100 WILT (Varamine, récolte 1964)

Genres et Espèces \ Milieux[x]	1	2	3	4	5	6
Aspergillus niger	66[xx]	68	65	57	56	56
Aspergillus flavus	34	35	30	23	22	24
Aspergillus flavus var.columnaris	21	23	20	16	18	19
Aspergillus wentii	31	32	30	31	29	30
Aspergillus candidus	12	13	11	7	10	8
Aspergillus fumigatus	12	14	11	6	9	7
Penicillium spp.	25	18	25	22	27	25
Fusarium moniliforme	31	29	28	38	36	40
Fusarium oxysporum	75	73	71	78	78	79
Fusarium solani	26	24	23	25	29	28
Fusarium roseum	0	0	0	0	0	0
Verticillium lateritium	0	0	0	0	0	0
Trichothetium roseum	0	0	1	1	0	2
Trichoderma viride	0	0	0	0	0	0
Rhizoctonia solani	2	1	2	3	4	3
Alternaria tenuissima	29	25	25	30	31	26
Alternaria tenuis	8	7	7	8	9	8
Alternaria dendritica	26	27	25	27	28	26
Stemphylium botryosum	3	4	4	3	3	3
Curvularia lunata	11	9	10	9	10	10

suite p. 41

TABLEAU I (suite)

Genres et espèces \ Milieux[x]	1	2	3	4	5	6
Nigrospora oryzae	6	5	4	5	5	5
Helminthosporium spiciferum	0	0	0	0	0	0
Stachybotrys atra	0	0	0	0	0	0
Dictyoarthrinium quadratum	0	0	3	1	2	1
Cladosporium sp.	0	0	0	0	0	0
Mucor racemosus	1	2	5	0	1	2
Rhizopus nigricans	42	44	49	40	42	40
Syncephalastrum racemosum	5	3	5	3	5	4
Ascotricha sp.	0	0	0	0	0	0
Chaetomium globosum	0	0	0	0	0	0
Chrysosporium luteum	0	0	0	0	0	0
Indice de Pollution	4,80	4,69	4,64	4,42	4,65	4,59
Pourcentage de germination	99 %	100%	100%	98 %	98 %	99 %

Pourcentage d'humidité : 6,7 %

x Milieux : 1 - Maltea au chloramphénicol
2 - de Czapek
3 - Extrait de navet
4 - Eau gélosée 1 %
5 - Extrait de terre
6 - Perlite humidifié à C.R. 50 %.

xx Chaque chiffre exprime la fréquence spécifique d'un champignon pour 100 semences.

TABLEAU II

MYCOFLORE EXTERNE DES SEMENCES DE COTONNIER VARIETE COKER 100 WILT (Kordkouy, récolte 1965).

Milieux* / Genres et espèces	1	2	3	4	5	6
Aspergillus niger	75**	74	73	70	68	70
Aspergillus flavus	55	54	52	50	48	44
Aspergillus flavus var.columnaris	40	41	40	39	37	35
Aspergillus wentii	51	54	50	49	50	46
Aspergillus candidus	31	33	30	29	18	24
Aspergillus fumigatus	24	25	22	21	20	20
Penicillium spp.	67	68	63	62	61	59
Fusarium moniliforme	60	65	62	68	69	60
Fusarium oxysporum	59	60	60	62	61	59
Fusarium solani	36	37	35	39	40	37
Fusarium roseum	0	0	0	0	0	0
Verticillium lateritium	0	0	0	0	0	0
Trichothetium roseum	58	57	56	59	60	62
Trichoderma viride	0	0	0	0	0	0
Rhizoctonia solani	18	17	15	20	24	22
Alternaria tenuissima	79	80	80	80	87	84
Alternaria tenuis	12	13	12	15	15	14
Alternaria dendritica	50	52	53	55	58	59
Stemphylium botryosum	5	5	4	6	4	6
Curvularia lunata	0	0	0	0	0	0

suite p. 43

TABLEAU II(suite)

Genres et espèces \ Milieux[x]	1	2	3	4	5	6
Nigrospora oryzae	23	21	22	24	21	20
Helminthosporium spiciferum	45	45	47	48	48	46
Stachybotrys atra	32	30	31	35	31	30
Dictyoarthrinium quadratum	7	7	8	8	8	5
Cladosporium sp.	21	22	20	24	25	20
Mucor racemosus	28	30	38	30	28	22
Rhizopus nigricans	50	51	55	49	41	47
Syncephalastrum racemosum	12	13	20	15	12	14
Ascotricha sp.	7	9	5	7	8	8
Chaetomium globosum	30	27	23	25	29	25
Chrysosporium luteum	0	0	0	0	0	0
Indice de pollution	9,68	9,90	9,76	9,84	9,71	9,38
Pourcentage de germination	95 %	96 %	95 %	94 %	95 %	96 %

Pourcentage d'humidité 6,9 %

x, xx : cf. page 41

TABLEAU III

MYCOFLORE EXTERNE DES SEMENCES DE COTONNIER VARIETE

ACALA 349 (Kordkouy récolte 1964)

Milieux[x] / Genres et espèces	1	2	3	4	5	6
Aspergillus niger	65[xx]	60	55	39	42	45
Aspergillus flavus	27	26	20	15	19	18
Aspergillus flavus var.columnaris	28	29	20	18	18	21
Aspergillus wentii	24	27	23	20	18	18
Aspergillus candidus	0	0	0	0	0	0
Aspergillus fumigatus	1	5	4	2	3	5
Penicillium spp.	20	17	23	12	15	10
Fusarium moniliforme	64	62	65	68	70	67
Fusarium oxysporum	22	18	20	19	23	19
Fusarium solani	16	16	15	17	15	17
Fusarium roseum	1	0	1	2	3	2
Verticillium lateritium	0	0	0	0	0	0
Trichothetium roseum	30	28	30	30	32	28
Trichoderma viride	0	0	0	0	0	0
Rhizoctonia solani	14	9	10	12	14	12
Alternaria tenuissima	65	72	70	71	74	75
Alternaria tenuis	11	9	8	10	8	9
Alternaria dendritica	8	8	7	10	12	9
Stemphylium botryosum	6	7	7	9	8	12
Curvularia lunata	10	9	10	12	10	11

suite p. 45

TABLEAU III (suite)

Genres et espèces \ Milieux[x]	1	2	3	4	5	6
Nigrospora oryzae	18	12	14	15	16	16
Helminthosporium spiciferum	14	12	12	14	16	17
Stachybotrys atra	0	0	0	0	0	0
Dictyoarthrinium quadratum	0	0	0	0	0	0
Cladosporium sp.	0	0	0	0	0	0
Mucor racemosus	4	5	5	2	5	5
Rhizopus nigricans	77	68	85	58	56	56
Syncephalastrum racemosum	8	5	15	7	4	9
Ascotricha sp.	0	0	0	0	0	0
Chaetomium globosum	0	0	0	0	0	0
Chrysosporium luteum	0	0	0	0	0	0
Indice de Pollution	5,33	5,04	5,19	4,62	4,81	4,81
Pourcentage de germination	87 %	84 %	87 %	87 %	88 %	85 %

Pourcentage d'humidité : 6,8 %

x, xx : cf. page 41

TABLEAU IV

MYCOFLORE EXTERNE DES SEMENCES DE COTONNIER VARIETE

108 F (Kordkouy récolte 1965)

Milieux[x] / Genres et espèces	1	2	3	4	5	6
Aspergillus niger	79[xx]	78	75	77	76	73
Aspergillus flavus	43	45	40	40	38	40
Aspergillus flavus var.columnaris	19	20	17	16	18	14
Aspergillus wentii	19	18	16	17	17	15
Aspergillus candidus	20	19	18	18	12	10
Aspergillus fumigatus	5	4	5	0	1	4
Penicillium spp.	65	70	63	62	67	67
Fusarium moniliforme	80	78	76	82	85	82
Fusarium oxysporum	18	16	17	17	21	18
Fusarium solani	6	7	9	7	9	11
Fusarium roseum	2	2	1	2	3	3
Verticillium lateritium	8	10	10	10	15	17
Trichothetium roseum	50	48	50	52	59	56
Trichoderma viride	21	20	19	20	19	18
Rhizoctonia solani	10	9	8	12	11	10
Alternaria tenuissima	73	73	72	74	80	74
Alternaria tenuis	6	5	5	4	8	5
Alternaria dendritica	48	49	48	54	52	50
Stemphylium botryosum	0	0	0	0	0	0
Curvularia lunata	0	0	0	0	0	0

suite p. 47

TABLEAU IV (suite)

Genres et espèces \ Milieux[x]	1	2	3	4	5	6
Nigrospora oryzae	25	24	24	28	25	20
Helminthosporium spiciferum	27	26	28	29	32	22
Stachybotrys atra	0	0	0	0	0	0
Dictyoarthrinium quadratum	30	31	29	36	24	29
Cladosporium sp.	0	0	0	0	0	0
Mucor racemosus	8	7	9	5	4	3
Rhizopus nigricans	57	60	62	58	48	47
Syncephalastrum racemosum	66	68	75	62	61	53
Ascotricha sp.	12	10	7	8	5	7
Chaetomium globosum	0	0	0	0	0	0
Chrysosporium luteum	0	0	0	0	0	0
Indice de pollution	7,97	7,97	7,83	7,90	7,90	7,48
Pourcentage de germination	98 %	97 %	98 %	97 %	98 %	96 %

Pourcentage d'humidité 6,9 %

x, xx : cf. page 41

TABLEAU V

MYCOFLORE EXTERNE DES SEMENCES DE COTONNIER VARIETE

BOUMI ARIA (Varamine récolte 1964)

Milieux* / Genres et espèces	1	2	3	4	5	6
Aspergillus niger	81**	85	62	66	61	68
Aspergillus flavus	28	27	23	31	19	27
Aspergillus flavus var. columnaris	9	6	7	10	9	8
Aspergillus wentii	8	8	7	9	9	10
Aspergillus candidus	8	9	4	5	5	4
Aspergillus fumigatus	15	15	16	17	16	16
Penicillium spp.	24	30	14	16	6	16
Fusarium moniliforme	38	36	35	44	48	44
Fusarium oxysporum	15	15	17	18	21	23
Fusarium solani	8	7	10	11	8	10
Fusarium roseum	12	10	10	12	13	13
Verticillium lateritium	0	0	0	0	0	0
Trichothetium roseum	16	13	17	19	16	17
Trichoderma viride	4	5	3	5	8	4
Rhizoctonia solani	1	2	1	1	3	1
Alternaria tenuissima	45	45	37	43	49	44
Alternaria tenuis	10	10	9	13	14	12
Alternaria dendritica	13	10	8	11	17	16
Stemphylium botryosum	0	0	0	0	0	0
Curvularia lunata	0	0	0	0	0	0

suite p. 49

TABLEAU V (suite)

Milieux[x] / Genres et espèces	1	2	3	4	5	6
Nigrospora oryzae	3	4	2	6	5	3
Helminthosporium spiciferum	19	18	7	21	19	20
Stachybotrys atra	0	0	0	0	0	0
Dictyoarthrinium quadratum	16	16	37	15	14	17
Cladosporium sp.	17	16	14	20	5	15
Mucor racemosus	4	2	29	3	6	4
Rhizopus nigricans	46	41	80	40	35	40
Syncephalastrum racemosum	12	13	10	13	10	12
Ascotricha sp.	0	0	0	0	0	0
Chaetomium globosum	0	0	0	0	0	0
Chrysosporium luteum	7	7	8	10	10	11
Indice de pollution	4,59	4,50	4,67	4,59	4,26	4,55
Pourcentage de germination	90 %	86 %	88 %	94 %	92 %	90 %

Pourcentage d'humidité 8 %

x, xx : cf. page 41

TABLEAU VI

MYCOFLORE INTERNE DES SEMENCES DE COTONNIER

	COKER 100 WILT Varamine						COKER 100 WILT Kordkouy						ACALA 349						108 F Kordkouy					
Milieux* / Genres et espèces	1**	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Aspergillus niger	***							1		1	1	1												
Aspergillus flavus	1	2	2	1	2	1	2	1	3	3	2	3	1	1				1						
Aspergillus wentii							1		1		1	1												
Fusarium moniliforme	2	1	2	2	1		1	2	1	3	2	2	2	2	3	1	2	2	2	2	2	3	2	2
Fusarium oxysporum	1	2	1	1	2	2	2	2	3	1	2	3	3	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	2
Fusarium solani	1	1	1	1		1	3	1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2	1
Alternaria tenuissima	2	1	1	2	1	1	1	3	2	1	2	2	3	3	3	4	4	3	2	4	3	2	2	3
Alternaria tenuis															1	1				1				1
Nigrospora oryzae																		1	1			1		
Rhizoctonia solani													1	2	1	1	1		2	2	3	2	3	2
Stemphylium botryosum													1											
Mucor racemosus															1			1						
Rhizopus nigricans																								
Bactéries													1											
Indice de Pollution	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,05	0,10	0,10	0,12	0,11	0,11	0,13	0,12	0,10	0,11	0,11	0,10	0,11	0,10	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11
Pourcentage de germination	99	100	99	99	98	99	96	96	95	95	94	96	86	87	85	86	88	88	98	97	96	98	97	96

*, ** cf. p. 41

*** L'absence de champignons sur les semences est représentée par les cases vides.

TABLEAU VI (suite)

	BOUMI ARIA						MONO						SAENZ PENA						REBA B 50					
Milieux / enres et espèces	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
spergillus flavus	1			1		1	2	2	3	3	2	3			1				1					
usarium moniliforme	2	2	1	2	1	2	1		2	1	1	1												
usarium oxysporum	2	2	1	2	1	1													3	2	3	2	2	1
usarium oxysporum f.sp. vasinfectum							2	1	1	1	2		14	16	13	15	14	15	5	6	4	5	4	4
usarium solani						1							3	2	2	2	2	3						
usarium roseum					1																			
lternaria tenuissima	1	1	2	1	2	2																		
lternaria tenuis			1				1	2	1		1	1	1	2	2	1	2	1						
ercularia lunata								1	1	1		2												
igrospora oryzae	1																							
ladosporium sp.		1																						
hizoctonia solani	1		2	1	1		1	1		2	2	1	3	2	2	1	2	3	2	3	3	3	4	4
ythium sp.							1			1														
hizopus nigricans		1																						
actéries	(1)																							
ndice de Pollution	0,08	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,08	0,07	0,08	0,09	0,08	0,08	0,24	0,22	0,20	0,19	0,20	0,22	0,11	0,11	0,10	0,10	0,10	0,09
ourcentage de ermination	88	92	87	92	90	91	74	75	74	73	73	72	78	80	81	78	80	79	80	82	81	81	82	81

TABLEAU VII

MYCOFLORE INTERNE DES SEMENCES DE COTONNIER.
PARASITES DES TEGUMENTS ET DES AMANDES

Variétés / Genres et espèces	COKER 100W Varamine		COKER 100W Kordkouy		349		108 F Kordkouy	
	Am.	Tég.	Am.	Tég.	Am.	Tég.	Am.	Tég.
Aspergillus niger	0	0	1	(1)	0	0	0	0
Aspergillus flavus	1[x]	0	3	0	0	0	0	0
Aspergillus wentii	0	0	0	1	0	0	0	0
Fusarium moniliforme	1	(1)[xx]	1	1	2	(2)+1	2	(2)
Fusarium oxysporum	2	(2)	1	(1)	2	(2)	2	(2)
Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum	0	0	0	0	0	0	0	0
Fusarium solani	1	(1)	1	(1)	2	(2)	1	(1)+1
Fusarium roseum	0	0	0	0	0	0	0	0
Alternaria tenuisssima	1	(1)+1	1	(1)+1	2	(2)+1	2	(1)+1
Alternaria tenuis	0	0	0	0	0	0	0	0
Stempphylium botryosum	0	0	0	0	0	0	0	0
Curvularia lunata	0	0	0	0	0	0	0	0
Nigrospora oryzae	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhizoctonia solani	0	0	0	0	1	(1)	1	(1)+1
Mucor racemosus	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhizopus nigricans	0	0	0	0	0	0	0	0
Indice de pollution des téguments et amandes	0,06	(0,05) +0,01	0,08	(0,04) +0,03	0,09	(0,09) +0,02	0,08	(0,07) +0,03
Indice de pollution	0,07		0,11		0,11		0,11	

suite p. 53

TABLEAU VII (suice)

	BOUMI ARIA		MONO		SAENZ PENA		REBA B 50	
	Am.	Tég.	Am.	Tég.	Am.	Tég.	Am.	Tég.
Aspergillus niger	0	0	0	0	0	0	0	0
Aspergillus flavus	0	0	3	0	0	0	0	0
Aspergillus wentii	0	0	0	0	0	0	0	0
Fusarium moniliforme	1	(1)+1	0	0	0	0	0	0
Fusarium oxysporum	2	(2)	0	0	0	0	1	(1)+1
Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum	0	0	1	0	7	(7)+6	3	(3)+2
Fusarium solani	0	0	0	0	2	(2)+2	0	0
Fusarium roseum	0	0	0	0	0	0	0	0
Alternaria tenuissima	1	(1)	0	0	0	0	0	0
Alternaria tenuis	0	0	0	0	1	(1)	0	0
Stemphylium botryosum	0	0	0	0	0	0	0	0
Curvularia lunata	0	0	0	0	0	0	0	0
Nigrospora oryzae	1	0	0	0	0	0	0	0
Rhizoctonia solani	1	(1)	1	0	2	(2)+1	3	(2)
Mucor racemosus	0	0	0	1	0	0	0	0
Rhizopus nigricans	0	0	1	(1)	0	0	0	0
Indice de pollution des téguments et amandes	0,06	(0,05) +0,01	0,06	(0,01) +0,01	0,12	(0,12) +0,09	0,07	(0,06) +0,03
Indice de pollution	0,07		0,07		0,21		0,1	

x Chaque chiffre exprime la fréquence spécifique de chaque champignon présent sur les téguments ou les amandes pour cent semences.

xxLes chiffres entre parenthèses représentent le nombre de cas où le même champignon se retrouve sur les amandes et sur les téguments de la même semence.

II-1 INFLUENCE DU MILIEU

II-1-1 Sur la mycoflore externe

II-1-1-1 Milieux riches en éléments nutritifs.

L'influence des milieux maltéa-chloramphénicol et Czapek est assez semblable. L'on y remarque, en général, une plus grande fréquence d'*Aspergillus spp.* et de *Penicillium spp.* qui y sont avantagés au dépens d'autres genres comme *Fusarium spp.* et *Alternaria spp.*.

D'autre part, les phycomycétes envahissent les boites au bout de 5 à 8 jours d'incubation, rendant les comptages et les isolements difficiles. Les souches isolées demandent souvent une purification.

Le milieu à l'extrait de navet, stimule fortement la croissance des phycomycétes qui envahissent fréquemment les boites. Les notations doivent être effectuées dans les quatre premiers jours d'incubation et les isolements sont malaisés.

II-1-1-2 Milieux relativement pauvres en éléments nutritifs.

L'eau et l'extrait de terre gélosés permettent des comptages et des isolements aisés. Les colonies y restent souvent limitées. On remarque une fréquence plus élevée des espèces des genres *Fusarium* et *Alternaria*.

Le milieu à l'extrait de terre présente surtout l'intérêt pratique de limiter le développement de *Rhizopus sp.* et permet d'obtenir des fréquences élevées des espèces potentiellement parasites.

La perlite humidifiée à 50 % de sa capacité de rétention a les mêmes avantages mais l'observation y est plus

difficile, certaines colonies pouvant être masquées par les grains de perlite.

En résumé :

1°) La surface des semences apporte des espèces fongiques variées qui sont différemment favorisées par la composition du milieu.

2°) Aucun milieu ne révèle toute la mycoflore superficielle. La connaissance de toutes les fréquences spécifiques vraies nécessiterait donc l'utilisation de plusieurs milieux adaptés aux différents genres de champignons que l'on peut rencontrer sur les semences.

3°) Conclusion pratique.

Les résultats obtenus sur un milieu, pour des semences données n'auront qu'une valeur relative par rapport à d'autres analyses faites dans les mêmes conditions sur d'autres semences et la fréquence d'isolement de certaines espèces fongiques sera dans ce cas sous-estimée. Cependant, dans la pratique, pour l'examen rapide des contaminants des semences de cotonnier, présentant généralement un indice de pollution élevé, il est préférable de choisir un milieu gélosé pauvre en éléments nutritifs qui permet des observations prolongées et des isolements aisés.

II-1-2 Sur la mycoflore interne

Nous n'observons aucune influence du milieu sur la fréquence des espèces isolées de l'intérieur des semences puisque ces dernières ne sont parasitées (sauf dans un cas) que

par une seule espèce fongique de sorte que celle-ci peut se développer soit sur le milieu soit sur la plantule même. Ici les milieux riches permettent des isolements plus rapides en stimulant la vitesse de croissance du champignon.

II-2 TENEUR EN HUMIDITE

Le pourcentage d'humidité des semences iraniennes analysées est relativement faible (6,7 à 8 %) et devrait permettre leur conservation prolongée en atmosphère relativement sèche. Ce fait ne confirme pas l'hypothèse d'une multiplication des champignons au cours de la conservation (VENKATRAM 1950).

II-3 POURCENTAGE DE GERMINATION.

Le taux de germination des semences varie suivant les variétés et les régions. Le délintage et la stérilisation superficielle n'affecte pas d'une façon sensible le pourcentage de germination quand les semences sont utilisées tout de suite après le traitement.

Les pourcentages moyens de germination calculés sur 1200 semences de chaque variété sont :

Coker 100 Wilt	(Varamine)	99 %
Coker 100 Wilt	(Kordkouy)	95,2 %
Acala 349	(Kordkouy)	86,5 %
108 F	(Kordkouy)	97,2 %
Boumi aria	(Varamine)	90 %

Le pourcentage de germination des semences des variétés Boumi aria et Acala 349 est assez faible.

Ces semences ont gardé leur capacité germinative intacte après 18 mois de conservation à la température du laboratoire.

II -4 INDICE DE POLLUTION

Toutes les semences présentent des indices moyens de pollution externe élevés.

Les indices moyens de pollution externe (calculés sur 600 semences) et interne (calculés sur 700 semences) sont plus élevés pour les semences récoltées dans la région de Kordkouy (Gorgan).

	Indices moyens de pollution externe	Indices moyens de pollution interne
Coker 100 W (Varamine)	4,63	0,066
Coker 100 W (Kordkouy)	9,71	0,111
Acala 349 (Kordkouy)	4,96	0,108
108 F (Kordkouy)	7,84	0,110
Boumi aria (Varamine)	4,52	0,070

II-5 GENRES ET ESPECES ISOLES.

31 espèces fongiques sont isolées à partir des semences iraniennes non délintées. Les genres les plus fréquemment rencontrés sont : Aspergillus, Fusarium, Alternaria, Rhizopus, Helminthosporium (cf. Tableaux I à V, pages 40 à 49).

15 espèces sont isolées à l'intérieur des semences, les genres le plus souvent rencontrés sont : Fusarium,

Alternaria, Rhizoctonia, Aspergillus (cf. Tableaux VI et VII, pages 50 et 51).

Toutes les espèces de la mycoflore interne sont retrouvées dans la mycoflore externe.

II-5-1 Le genre Fusarium

Toutes les semences, ou presque, sont contaminées par une des espèces de ce genre.

II-5-1-1 Fusarium moniliforme (Sheld.) Sn.et Hansen.

Le stade conidien de Gibberella fujikuroï a été signalé comme contaminant externe (WOODROOF (1927)) ou parasite interne (HANSFORD (1929) ; CHESTER (1938) ; LEHMAN (1939) ; BAIN (1939) ; RUDOLPH et coll. (1945) ; Anonyme (1952)) des semences de cotonnier. WICKENS (1964) l'isole à partir des téguments de semences.

RUDOLPH et coll. (loc. cit.) constatent que le mycelium de cette espèce, parmi d'autres du même genre, atteint la graine par la voie du xylème qu'il occupe en saprophyte. CHESTER ainsi que BAIN (loc. cit) remarquent que F. Moniliforme et oxysporum sont les plus fréquents à l'intérieur des semences ayant une densité supérieure à celle de l'eau. ARNDT (1946) signale que le champignon provoque une diminution de la faculté germinative et que les semences ayant perdu cette faculté sont infectées principalement par F. moniliforme.

Une grande confusion règne dans la littérature quant à l'importance des dégâts causés par F. moniliforme dans les maladies de plantules de cotonnier. Les résultats contradictoires sont probablement liés à la grande différence de

pathogénicité des souches observées (VORHEES (1933) ; ARNDT (1957) ; COGNEE (1960) ; CAUQUIL et coll. (1965).

WOODROOF (1927), MASSEY (1934) ; MILLER (1938) ; MILLER et coll. (1940-1941) ; CHESTER (1941) ; RAY et coll. (1942) ; FULTON et coll. (1956) attribuent une part importante à F. moniliforme dans les maladies de plantules de cotonniers, tandis que ARNDT et coll. (1937) ; ARNDT (1945-1957) ; LE GALL (1961) lui attribuent un rôle de pathogène secondaire ou mineur provoquant des lésions occasionnelles.

Ainsi F. moniliforme provoque suivant les auteurs :

- des fontes de semis en préémergence et en postémergence (VENKATRAM 1950-1951) accompagnées de rabougrissement des plantules (COGNEE (1960)), la pourriture sèche des racines (WOODROOF (1927)) ou celle des tiges (CELINO (1936)).

- la nécrose du collet et l'aplatissement latéral des hypocotyls (HARROLD (1943)) ou des maladies du type "Sore Skin" (HANSFORD (1937)).

- des lésions hypocotyles ou cotylédonaires occasionnelles (ARNDT (1945-1957)) sans entraîner des fontes de semis.

Signalons d'autre part, que F. moniliforme peut entraîner des pourritures de capsules (WOODROOF (1927) , MILLER (1939) MILLER et coll. (1939), Anonyme (1946), SCHNATHORST et coll.(1960) CAUQUIL et coll.(1965), DRANSFIELD et coll. (1966)) et semble provoquer des détériorations de fibres de coton (MARSH et coll. (1949)).

F. moniliforme existe en forte proportion sur les semences iraniennes. Les graines récoltées à Kordkouy présentent

une plus forte contamination (59-85 %) que celles récoltées à Varamine (18-48 %) (cf. Tableaux I à V). Il parasite environ 2 % des semences. Sur 54 isolements à partir des semences délintées, stérilisées superficiellement, 4 provenaient de semences qui n'ont pas germé. Cette dernière observation contredit celle d'ARNDT (1946) et nous pensons qu'il n'existe aucune corrélation entre la capacité germinative des semences et la présence interne de F. moniliforme.

Nous avons isolé (3 fois) cette espèce à partir de plantules se développant dans des pots au laboratoire. Les symptômes observés sont d'abord des lésions cotylédonaires puis une pourriture brune de la tige entraînant la mort de la plantule.

F. moniliforme peut infecter aussi bien les téguments que les amandes ou les deux à la fois.

D'après nos connaissances, F. moniliforme n'avait pas été signalé sur semences et plantules de cotonnier iranien. Ce champignon joue donc très probablement, seul ou en association avec d'autres parasites, un certain rôle dans les maladies des plantules en Iran.

II-5-1-2 **Fusarium** oxysporum (Sheld.) Sn. & H.

La fréquence de cette espèce sur les semences iraniennes dépend de la variété et varie dans une gamme assez large (15-79 %).

Isolé de l'intérieur des semences (environ 2 %), il parasite aussi bien les téguments que les amandes.

Les souches isolées présentent des caractères biométriques et culturaux différents de ceux de F. oxysporum f. sp. Vasinfectum (Atk.) Sn & H., ce dernier ne semble pas exister sur les semences iraniennes. Nous ne sommes pas en mesure de dire si certaines souches isolées sur plantules ou à l'intérieur des semences peuvent induire le Wilt du cotonnier. Notons cependant que d'autres Fusarium différents de F.O. f. sp. Vasinfectum peuvent induire le Wilt du cotonnier (DONGO (1965), ARMSTRONG et coll. (1965), NAÏM (1965), CIOCAN et coll. (1962).

Les symptômes observés au laboratoire sur un nombre très limité de plantules sont ceux d'une fonte de semis typique. Ce fait est conforme aux observations de CAUQUIL et coll. (1966).

Signalons que F. oxysporum infecte aussi les semences de la Variété Réba B 50 récoltées au Cambodge.

II-5-1-2-1 Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum (Atk) Sn. & H.

Agent d'un "Wilt" du cotonnier est l'un des plus importants parasites fongiques du cotonnier dans le monde et peut attaquer la plante à tous les stades de sa croissance.

F. O. f. sp. vasinfectum est un contaminant des semences et peut les parasiter (TAUBENHAUS et coll. (1932), RADA (1935), Mc CORMACK (1939) Anonyme (1951), LAGIERE (1952), PERRY (1961), VIEGAS (1961)).

WICKENS (1963) l'isole à partir des téguments de semences. Quant à nous, nous l'avons isolé des semences des Variétés Saenz Pena, Mono et Reba B 50, aussi bien des téguments que des amandes.

Les souches isolées à partir des variétés indiquées qui sont pourtant d'origines différentes ont des caractères morphologiques et culturaux identiques. Ces caractères sont les mêmes que ceux décrits par WOLLENWEBER et REINKING (1935) et BUGNICOURT (1939).

Notons que 15 % des semences de la variété Saenz Pena, sont infectés par F.O. f. sp. vasinfectum. Cette fréquence est plus élevée que celle rapportée par les différents auteurs précités.

II-5-1-3 Fusarium solani (Mart.) (App. & We.) Sn & H.

Stade conidien d'Hypomyces solani (Rke. & Berth.) Sn. & H. ; il contamine les semences et les parasite à environ 1 %. Nous l'avons isolé des téguments et des amandes. F. solani est l'un des agents des fontes de semis en Iran (CAUQUIL et coll. (1966)).

II-5-1-4 Fusarium roseum (LK.) Sn. & H.

Une variété (F. avenaceum) de cette espèce semble être associée aux agents des fontes de semis en Iran (CAUQUIL et coll. (1966)). F. roseum contamine une faible proportion des semences analysées et nous l'avons rencontré une seule fois à l'intérieur d'une semence.

II-5-2 Le genre Alternaria

3 espèces de ce genre ont été observées sur les semences analysées.

II-5-2-1 Alternaria tenuissima (Fries) Wiltshire

Cette espèce de la section des "Claroseminae" est un élément banal de la flore des semences (JOLY (1964)) mais

d'après nos connaissances, aucun auteur ne la mentionne parmi la mycoflore interne ou externe des semences de cotonnier. Présent sur la majorité des semences iraniennes analysées, il peut les parasiter et se loger dans les téguments aussi bien que dans l'amande.

Les symptômes observés sur plantules (10) cultivées en pots, et inoculées par piqûre au niveau du collet sont des nécroses cotylédonaires s'étendant vers l'axe hypocotyle où s'établissent des nécroses allongées. D'autre part, le même micromycète a été isolé de 2 plantules non inoculées présentant une pourriture de l'axe hypocotyle et des nécroses foliaires au stade 2 feuilles. Aucun autre microorganisme n'était associé à ces nécroses.

Alternaria tenuissima est généralement considéré comme un parasite de faiblesse ayant un pouvoir pathogène réduit, cependant il existe des souches plus virulentes à l'égard d'hôtes déterminés telle A. tenuissima var. godetiae (NEERGARD (1945)).

Les observations que nous venons de rapporter montrent que ce champignon peut être un parasite interne des semences de cotonnier et l'on peut supposer que certaines de ses souches sont susceptibles de jouer un rôle actif dans les fontes de semis du cotonnier. Mais des observations plus nombreuses et des expériences au champ seraient nécessaires pour déterminer sa virulence et son pouvoir pathogène.

Nous donnons brièvement les caractères biométriques et culturaux de 2 souches isolées, l'une (I) sur plantules,

l'autre (II) sur semences de cotonnier :

Sur milieu maltéa 5 % gélosé 1,5 %, le champignon croît normalement en phase intermédiaire (mycélium aérien abondant - aspect cotonneux). La colonie, vert-olive foncée présente des conidiophores formant une chaîne de conidies (4 à 10) parfois ramifiée au niveau de l'apex de conidies géniculées. La couleur claire des conidies échinulées ou grenues et l'aspect de la colonie sont des indications précieuses pour distinguer cette espèce de l'A. tenuis, qui présente une colonie brune-noire, d'aspect grenue du moins durant le premier mois après son isolement et des conidies brunes et verruqueuses.

Les mensurations effectuées sur 100 conidies de chaque souche sont comparables à celles données par JOLY (1964) (Tableau ci-dessous).

	Longueur des spores	Largeur des spores	Spores munies d'apex x	Rétrécissement apical
I	26,6 µ (12,8-44,3) σ =6,6	10,3 µ (7,1-14,4) σ = 1,42	75 %	6,2 µ (2,9-12,8) σ = 3,20
II	26,4 µ (12,5-45) σ = 6,7	9,8 µ (6,1-15) σ = 1,1	76 %	6,5 µ (3-11,5) σ = 2,91

x les apex géniculés ne sont pas pris en considération.

II-5-2-2 Alternaria tenuis Nees

Rapporté par de nombreux auteurs comme parasite des semences des plantules ou des feuilles de cotonnier, il contamine 4-15 % des semences iraniennes analysées, et les parasite dans de

faibles proportions (1,3 °/₀₀). Par contre, il est relativement plus fréquent dans les graines des variétés Mono et Saenz Pena (1-2 %).

II-5-2-3 Alternaria dendritica (de S. da Cam.) JOLY

D'après l'insertion typique des conidies sur les conidiophores, cette espèce saprophyte banale, pourrait être rapportée au genre Ulocladium tel qu'il a été défini par SIMMONS (1967).

CAUQUIL (1963) signale que les amandes des semences récoltées à Kordkouy sont infectées à 30 % par Alternaria macrospora. Cette espèce très différente de A. tenuis ou A. tenuissima est aisément reconnaissable et pourtant elle n'est apparue sur aucune des semences que nous avons analysées.

II-5-3 Le genre Aspergillus.

Nous avons observé les espèces suivantes sur les semences iraniennes : A. niger ; A. flavus, A. wentii ; A. candidus et A. fumigatus.

La plus répandue en contamination externe est A. niger suivie par A. flavus.

Seuls A. niger, A. flavus et A. wentii ont été isolés de l'intérieur des semences. A. flavus n'a été rencontré que dans les téguments des semences, aucune amande n'est parasitée par cette espèce. Ces champignons ont été signalés comme parasites de semences par différents auteurs (DI FONZO (1942) ; ARNDT (1946) VENKATRAM (1950) ; Anonyme (1952)). Selon VENKATRAM (1950), A. fumigatus est capable de parasiter les semences. Il ne semble pas que cette espèce joue de rôle appréciable dans le

matériel en provenance de l'Iran.

Les espèces contaminantes isolées peuvent provoquer des détériorations de la qualité des fibres (WHITE et coll. (1948) ; MARSH et BUTLER (1949) ; MARSH et coll. (1949) ; KARPOVA-BENUA (1954) ; HALL et coll. (1951); KOVACHE et coll. (1954) ; NOPITSCH et coll. (1958)); et des semences conservées dans de mauvaises conditions (DI FONZO (1942) ; CHRISTENSEN et coll. (1949)).

D'autre part, A. niger et A. flavus sont des organismes susceptibles d'entraîner des pourritures des capsules (SCHNATHORST et coll. (1960) ; CAUQUIL et coll. (1965)) tandis que A. niger, A. fumigatus, et A. flavus sont souvent associés aux maladies de plantules de cotonnier (VENKATRAM (1951)).

II-5-4 Autres genres

II-5-4-1 Rhizoctonia solani Kühn

Forme mycélienne de Thanatephorus cucumeris (FRANK) DONK., ce champignon entraîne des fontes de semis importantes dans la culture cotonnière iranienne (CAUQUIL et coll. (1966)). Présent sur toutes les variétés on le rencontre cependant plus fréquemment sur les semences récoltées à Kordkouy (Gorgan). Ce parasite considéré généralement comme appartenant à la flore du sol a été signalé pour la première fois comme parasite des semences de cotonnier par PEEPLES et coll. (1966).

En dehors des caractéristiques morphologiques et culturales typiques, l'existence au niveau des cloisons mycéliennes de R. solani, de dolipores (MOORE et coll. (1962)) bien visibles (BRACKER et coll. (1963)) en contraste de phase négatif, est une

indication utile pour la caractérisation de cette espèce.

Nos observations confirment les résultats de PEEPLES et coll. (Loc. cit.) et montrent de plus que le parasite est capable d'infecter aussi bien les téguments que les amandes des semences ; ce fait n'avait pas encore été signalé.

II-5-4-2 Nigrospora oryzae (B. & Br.) Petch.

Sur les bases des caractères culturaux et biométriques, nos isolements ont été identifiés comme appartenant au Nigrospora oryzae (MASON (1933)). HUDSON (1963) a démontré l'appartenance de cette espèce au cycle de Kushia oryzae (Sphaeriales) et discute de la variation biométrique des conidies suivant l'origine des souches étudiées.

N. oryzae, espèce très voisine de N. gossypii diffère de cette dernière, selon ROGER (1953) par le fait qu'elle attaque seulement les monocotylédones. N. gossypii a été souvent rapporté comme parasite de semences, agent de pourriture des capsules ou de détériorations des fibres de coton (LAGIERE et coll. (1954); BONDAROVITCH (1961) ; NASYROV (1962)). Cependant, d'après HOUSTON et coll. (1959) ; SCHNATHORST et coll. (1960), N. oryzae peut entraîner les mêmes symptomes sur le cotonnier. Ainsi l'observation de ROGER en ce qui concerne la différence entre N. oryzae et N. gossypii ne se trouvant pas justifiée, nous avons opté pour N. oryzae.

Pour affirmer l'identité des 2 espèces, il serait nécessaire de comparer les caractères biométriques et culturaux de nombreuses souches d'origines différentes.

II-5-4-3 Rhizopus nigricans Ehrenb.

Contaminant normal des semences et parasite de faiblesse, il se rencontre très fréquemment sur les semences analysées et peut les parasiter dans une faible proportion. Déjà signalé comme parasite des semences (ASHOUR(1956-1957)), il peut provoquer des pourritures de capsules (Anonyme (1946) ; HALISKY et coll. (1961); WILES (1963) ; PINCKARD (1964) ; HALISKY et coll. (1964) ; SIMPSON et coll. (1965)) et entraîner des détériorations de la qualité des fibres (SIMPSON et coll. (Loc. cit.) ; MARSH et coll. (1961).

Parmi les autres genres et espèces isolés sur les semences signalons : Stachybotrys atra,Ascotricha sp., Chaetomium globosum, Chrysosporium luteum, Stemphylium botryosum, tous cellulolytiques actifs, pouvant entraîner des pertes importantes de fibres, si le coton est emmagasiné dans de mauvaises conditions d'humidité et de température (WHITE et coll. (1948) ; MARSH et coll. (1949) ; ABRAMS (1950) ; KOVACHE et coll. (1954); HEYN (1958) ; CARMICHAEL (1962)).

II-5-4-4 Trichothetium roseum Link. ex Fr.

Semble s'associer dans certaines conditions aux agents de pourriture des capsules (MARCHIONATTO (1939)).

Remarquons enfin, que les semences iraniennes sont très faiblement contaminées et parasitées par les bactéries.

II-6 RECHERCHES PARTICULIERES POUR LA MISE EN EVIDENCE DE *Verticillium dahliae* SUR LES SEMENCES.

La transmission de *Verticillium dahliae* par les semences de cotonnier a fait l'objet de nombreux travaux mais les résultats obtenus sont souvent contradictoires.

TAUBENHAUS (1936-1937) isole le parasite de l'intérieur des graines mais formule ensuite (d'après RUDOLPH et coll. 1944) des doutes sur ses propres résultats. YUEN et TAN (1958) isolent le parasite à partir des semences délintées à l'acide sulfurique et avancent des pourcentages d'infection allant jusqu'à 40 %. Pour reprendre l'expression de MASSENOT (1964), ces résultats semblent extraordinaires. Par ailleurs, ALLEN (1951) inocule par injection des semences de cotonnier et isole le pathogène 8 mois plus tard ; il en conclut que celui-ci peut se transmettre par les semences. Par contre, MILES (1934), CHEO (1944) ainsi que RUDOLPH et coll. (1944) (malgré 5 années d'expériences précises sur des semences provenant de plantes malades) ne peuvent isoler le champignon de l'intérieur des semences et considèrent que les graines des plantes malades ne sont pas contaminées. Nos observations personnelles semblent confirmer les travaux de ces auteurs et en conséquence, nous pensons que l'infection interne des semences par *Verticillium dahliae* est fort improbable.

La contamination externe fait l'objet des mêmes controverses. HANSFORD (1937), CHEN et coll. (1964), EVANS et coll. (1966) isolent le champignon à partir des fibres adhérant aux

téguments des semences ; Anonyme (1936-1937) ; WICKENS (1948) ; IN (1958) ; COGNEE (1963); CAUQUIL (d'après MASSENOT 1964) pensent que Verticillium est transmissible par les semences sans toutefois en apporter de preuves précises, tandis que RUDOLPH et coll. (loc. cit), SOLOVEVA et coll. (1948), Anonyme (1947) estiment que ce mode de transmission est négligeable.

Nos expériences d'analyse de la mycoflore par la méthode d'ULSTER modifiée n'ont pas mis en évidence Verticillium dahliae comme contaminant des semences. De même, les méthodes particulières employées (cf. 1-1-3) ne nous ont pas permis de déceler la présence de Verticillium.

La méthode proposée par NADAKAVUKAREN et coll. (1959) (cf. I-1-1-3-1) permet la croissance de nombreux Aspergillus, Fusarium et Alternaria sur le milieu de culture et ne semble pas très spécifique du Verticillium, cependant des microsclérotes introduits artificiellement dans l'eau de lavage des semences (environ 10 microsclérotes/ml d'eau de lavage) donnent naissance à des colonies identifiables. De même la méthode d'EVANS et coll. (1966) (cf. I-1-1-3-2) permet une bonne observation sur les membranes Millipore des microsclérotes, quand ils sont présents. N'ayant pu détecter la présence du champignon sur plus de 9.000 semences analysées par différentes méthodes nous sommes amenés à penser, sans mettre en doute les travaux d'EVANS et coll. (loc. cit.), que la transmission du Verticillium dahliae par les semences est négligeable dans le cas des cotonniers iraniens, cependant des observations étendues sur plusieurs années seraient nécessaires avant de confirmer entièrement ces résultats.

II-7 CONCLUSION

Les fontes de semis sont après la verticilliose, le problème phytopathologique le plus important et entraînent de lourdes pertes dans certaines aires de cultures du cotonnier en Iran où elles provoquent la destruction de 50-70 % des plantules un mois après la levée (CAUQUIL 1963).

Au cours de notre travail, nous avons mis en évidence l'importance de la mycoflore des semences sur l'incidence des maladies des plantules. En effet, tous les champignons pathogènes signalés comme agents de maladies de plantules des cotonniers iraniens, hormis Verticillium dahliae, ont été observés sur les semences.

Quoique des parasites comme Fusarium spp., Rhizoctonia solani, Aspergillus spp., Alternaria spp. soient transmissibles par le sol, leur présence ainsi que celle d'autres agents pathogènes sur les semences, et par suite dans l'environnement immédiat de la radicule, revêt une grande importance durant les premiers stades de la croissance, où la plantule encore fragile peut être attaquée d'autant plus facilement que plusieurs pathogènes peuvent entrer en association synergique (PRASAD (1944) ; WILES (1963) ; MAIER (1965)).

Il ressort de cette étude que :

1 - Dans la pratique d'analyse rapide de la mycoflore externe des semences de cotonniers, il est préférable de choisir un milieu gélosé relativement pauvre en éléments nutritifs. Des milieux plus riches sont conseillés pour la mise en évidence de la mycoflore interne.

2 - Alternaria tenuissima est transmissible par les semences et peut provoquer des maladies des plantules de cotonnier. Nous sommes à notre connaissance les premiers à avoir observé ce fait. A. macrospora n'a pas été observé sur les semences que nous avons analysées.

3 - Rhizoctonia solani est transmissible par les semences de cotonnier. Nous confirmons ainsi les observations de PEEPLES et coll. (1966). De plus, nous constatons que le parasite peut infecter les téguments aussi bien que les amandes des graines.

4 - La dissémination et la transmission de Verticillium dahliae par les semences analysées est négligeable.

5 - Fusarium moniliforme entraîne probablement une partie des pertes de plantules en Iran.

Les F. oxysporum isolés sont morphologiquement différents de F.O. f.sp. vasinfectum agent d'un "Wilt" du cotonnier.

6 - Les semences iraniennes de par les organismes cellulolytiques actifs qui les contaminent peuvent être endommagées si elles sont emmagasinées dans de mauvaises conditions de température et d'humidité, ce qui semble être le cas pour certaines régions de grande production de l'Iran (GUTNECHT et coll. (1965)).

7 - La contamination bactérienne des semences analysées est très faible.

8 - Nous n'avons pas pu isoler à partir des semences, des parasites importants, tels que Glomerella gossypii,

Ascochyta gossypii ou Thielaviopsis basicola qui entraînent de lourdes pertes à la levée des plantules dans d'autres pays.

9 - Des études plus importantes seraient nécessaires pour déterminer l'incidence des différentes espèces de champignons isolés sur les maladies de plantules, la pourriture des capsules et leur importance dans la détérioration des semences et des fibres de cotonnier.

III - TROISIEME PARTIE

III-1 Influence des exsudats radicellaires des plantules de cotonniers sensible, tolérants et résistant sur certains aspects du métabolisme de *Verticillium dahliae* Kleb.

III-2 Analyses des exsudats radicellaires de plantules de cotonniers sensible, tolérants et résistant au *Verticillium dahliae*.

III-3 Discussion et conclusion.

III-1 INFLUENCE DES EXSUDATS RADICELLAIRES DES PLANTULES DE COTONNIERS SENSIBLE, TOLERANTS OU RESISTANT SUR CERTAINS ASPECTS DU METABOLISME DE V. dahliae.

L'interaction hôte-parasite a fait l'objet de nombreux travaux souvent orientés vers les réactions de l'hôte après l'infection, mais tous les phénomènes subséquents à l'interaction parasite-plante infectée concernent cette association et non seulement l'hôte. En effet, on devrait considérer la plante parasitée comme un nouvel organisme, différent de la plante saine, dans lequel de nouvelles caractéristiques entrent en jeu qui ne sont pas la somme des processus métaboliques de l'hôte et du parasite mais la conséquence des effets mutuels des deux partenaires. Cependant, il ne faut pas oublier que dans le cas des parasites pathogènes transmis par le sol ("Soil-borne pathogens"), ce qui est le cas pour Verticillium dahliae, l'interaction hôte-parasite commence avant l'infection, au niveau de la rhizosphère, principalement par l'intermédiaire des exsudats radicellaires de l'hôte et l'absorption par les racines des substances libérées par le parasite dans le milieu ambiant.

Les exsudats de différentes espèces ou variétés de plantes ont des effets différents sur la microflore de la rhizosphère, voir par exemple : TIMONIN (1940), SCHROTH et coll. (1964), ROVIRA (1959, 1965, 1965), BOULLARD (1966), SULOCHANA (1958), NAIM et coll. (1958). Souvent l'apport d'aliments que constituent les exsudats lève la "fongistase" du

sol et induit la germination des spores ou des sclérotes des champignons saprophytes ou parasites. Toutefois, on connaît des exemples d'inhibition de la germination des spores par des exsudats. Ainsi BUXTON (1957) démontre, dans le cas des exsudats de trois variétés de pois ayant des degrés de tolérance différents envers les races physiologiques de Fusarium oxysporum Fr. f. sp. pisi (Linf.) Sn. & H., l'existence d'un effet inhibiteur spécifique. Les exsudats de la variété résistante à une race donnée du champignon inhibent la germination des conidies tandis que ceux de la variété sensible la stimulent.

Une diminution relative de la germination des propagules ou de la croissance mycélienne, sous l'action des exsudats diminue la densité d'inoculum au niveau de la rhizosphère et peut permettre à la plante d'échapper plus facilement à l'infection. Mais on peut penser que des altérations métaboliques ont lieu chez le parasite, sous l'action (directe ou indirecte) des exsudats radicellaires, sans que la germination des spores ou la croissance mycélienne soient affectées d'une façon spectaculaire ; ces altérations pourraient alors réduire dans une certaine mesure le pouvoir infectieux ou la pathogénicité du parasite, ou son aptitude à supporter les actions antagonistes de la microflore du sol.

Dans le métabolisme cellulaire, les oxydations biologiques occupent une position centrale. Chez les microorganismes aérobies la plupart des processus métaboliques étant en corrélation avec la respiration, toute substance exerçant un effet

quelconque sur celle-ci pourrait modifier les autres aptitudes physiologiques du microorganisme.

Nous avons envisagé que, dans le cas particulier d'une plante hôte en présence d'un parasite donné les substances exsudées par les racines de la plante pourraient agir sur la respiration du parasite. Partant d'une telle hypothèse, nous avons entrepris l'étude de l'action des exsudats radicellaires des plantules de cotonniers sensible, tolérants et résistant sur la respiration du mycélium et des conidies de Verticillium dahliae.

Parallèlement, nous avons déterminé la croissance du mycélium et la germination des conidies en présence de ces différents exsudats.

Le Verticillium dahliae, agent du "Wilt" du cotonnier est un "soil-invader" (WILHELM 1951) ou plutôt un "root inhabitant" au sens de Garrett (PARK 1963). Il se conserve dans le sol sur les débris végétaux, surtout sous forme de microsclérotes (GREEN (1960) ; SCHREIBER et coll. (1962)). Les exsudats radicellaires des plantes induisent la germination de ces microsclérotes et provoquent l'émission de l'hyphe infectante (SCHREIBER (1962) ; SCHREIBER et coll. (1963)) ou la production de nombreuses conidies qui pourraient jouer, malgré leur survivance limitée dans le sol, un certain rôle dans l'épidémiologie de la maladie (SEWELL (1959)). Le parasite peut infecter le cotonnier à tous les stades de sa croissance et en particulier au stade plantule (PRESLEY (1950) ; WILES (1952) ; FEDOTOVA et coll. (1963) ; YANKOVSKAYA (1966) ; GARBER et coll. (1966)).

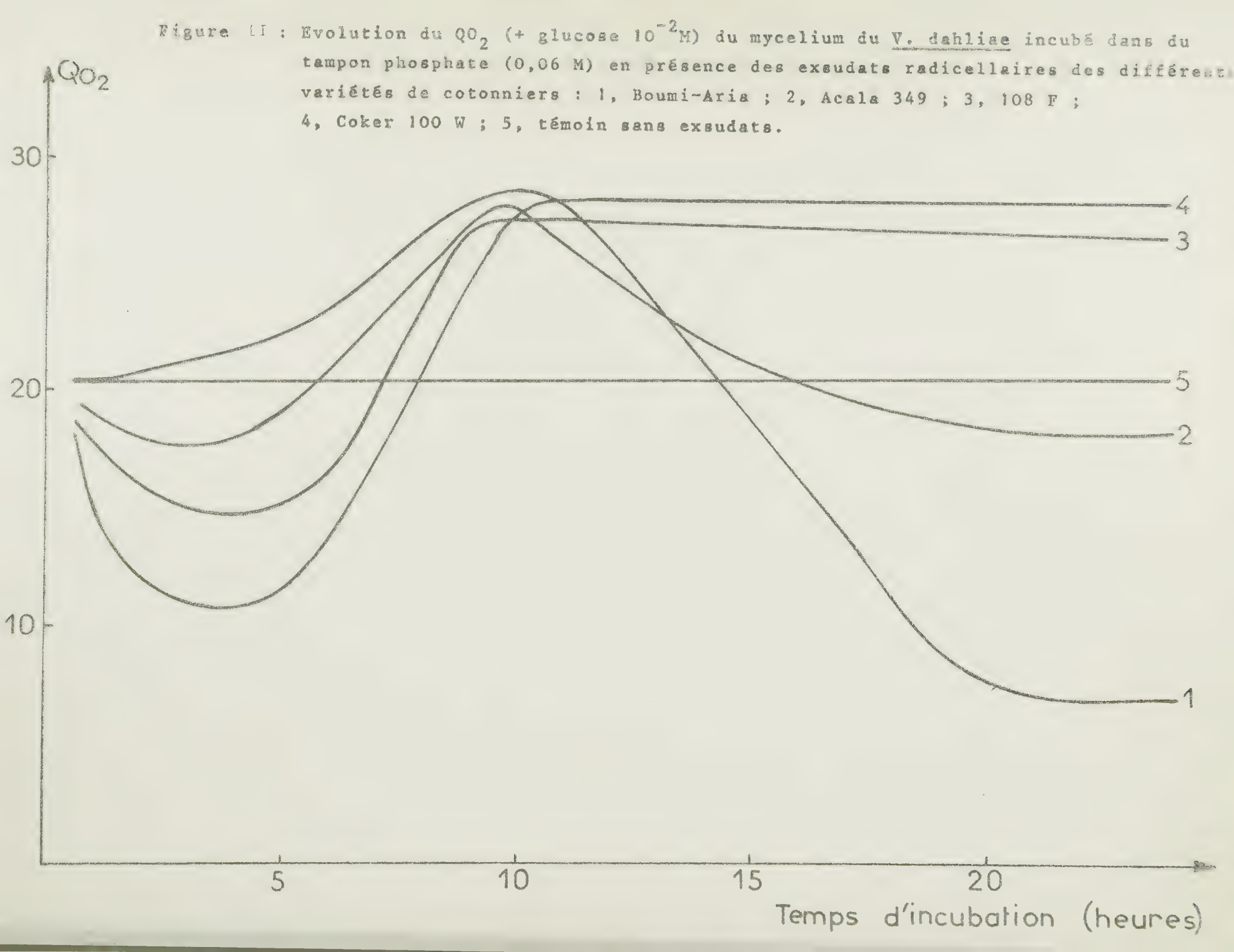
Remarque :

Il existe une très vive controverse quant à la valeur spécifique du taxon Verticillium dahliae. De nombreux auteurs considèrent que V. dahliae qui diffère principalement de V. albo-atrum par la formation de ses microsclérotes, fait partie de la même espèce : V. albo-atrum Rke & Berth. Une revue de la littérature se rapportant à ce sujet a été publiée récemment par ISAAC (1967).

Nous ne prendrons aucune position dans ce débat. Nous appellerons notre souche V. dahliae parce qu'elle a été enregistrée sous ce nom à la mycothèque de l'E.N.S.A. de Grignon.

Il est important de rappeler que la souche de V. dahliae dont nous disposons correspond au V. albo-atrum "microsclérotial. form (ou type)" de nombreux auteurs américains. Indiquons aussi qu'il existe à l'intérieur de l'espèce des races physiologiques (GRIFFITHS et coll. (1966)) ou des biotypes ayant des degrés de virulence et des capacités d'infection variables(PANTON (1964), SCHNATHORST et coll. (1966-1966), MATHRE et coll. (1966), ISAAC (1966)). D'autre part la pureté génétique de l'isolement semble être importante dans les travaux expérimentaux (LITVINOV (1964)) ; c'est pourquoi nous avons travaillé sur un repiquage monospore de V. dahliae.

Figure II : Evolution du QO_2 (+ glucose 10^{-2}M) du mycelium du V. dahliae incubé dans du tampon phosphate (0,06 M) en présence des exsudats radicellaires des différentes variétés de cotonniers : 1, Boumi-Aria ; 2, Acala 349 ; 3, 108 F ; 4, Coker 100 W ; 5, témoin sans exsudats.



III-1-1. Action des exsudats radicellaires des cotonniers sur la respiration du mycélium de V. dahliae.

La vitesse de la respiration des champignons est fonction de l'age des cellules, de la nature du milieu de culture et de la température de croissance (DARBY et coll. (1950a), MANDELS (1963), BLUMENTHAL (1963), VAN ETTEN et coll. (1966)). Nous avons donc toujours opéré dans les mêmes conditions (cf. I-2 et I-3).

Les résultats obtenus sont rapportés dans la fig. 2.

Les expériences ont été répétées 4 fois (2 répétitions chaque fois) avec des exsudats provenant de récoltes différentes. La phase délicate de l'expérience est l'homogénéisation du mycélium dans le tampon. Une homogénéisation brutale entraîne une chute du QO_2, probablement par suite de la dislocation du mycélium.

Les courbes de la figure 2 montrent que :

1°) Le QO_2 du mycélium dans le tampon phosphate (0,06 M) en présence d'air et de glucose et en absence d'exsudat reste constant (QO_2 ≠≠ 20) durant toute la durée de l'incubation (droite 5).

2°) Dans le cas du mycélium incubé en présence des exsudats de la variété résistante (courbe 1), le QO_2 s'accroît progressivement pendant les premières heures de l'incubation pour atteindre après 10 h. une valeur maximum (QO_2 ≠≠ 29). Par la suite le QO_2 diminue progressivement et se stabilise après 20 h. aux environs de QO_2 = 7.

3°) Dans le cas du mycélium incubé en présence des exsudats de la variété sensible (courbe 4), le QO_2 est d'abord inhibé et atteint une valeur minimum après 3 h. d'incubation. On observe ensuite une augmentation progressive du QO_2 qui passe par une valeur maximum, après environ 10 heures (QO_2 ≠≠ 28), pour rester constant jusqu'à la fin de l'incubation et à un niveau plus élevé que celui du témoin sans exsudat.

Ainsi pendant les premières heures de l'incubation, le QO_2 est le plus élevé dans le cas du mycélium incubé en présence des exsudats provenant du cotonnier résistant et le plus faible dans le cas du mycélium incubé en présence des exsudats de la variété sensible. En revanche à partir de la dixième heure d'incubation, le QO_2 reste constant dans le cas de la variété sensible alors qu'il est de plus en plus inhibé au fur et à mesure que se poursuit l'incubation en présence des exsudats de la variété résistante.

4°) Les actions des exsudats des 2 variétés tolérantes (Acala 349 (courbe 2) plus tolérante que 108 F (courbe 3)) sur le QO_2 du mycélium sont intermédiaires entre l'action des exsudats de la variété sensible et celle de la variété résistante et toujours en corrélation avec leur degré de résistance au parasite.

TABLEAU VIII

RESPIRATION DES CONIDIES DE V. DAHLIAE INCUBEES EN ABSENCE (TEMOIN) OU EN PRESENCE DES EXSUDATS RADICELLAIRES DES COTONNIERS SENSIBLE (Coker 100 Wilt), TOLERANTS (108 F et Acala 349) OU RESISTANT (Boumi aria) AU PARASITE.

Temps d'incubation (heures)	QO_2				
	Boumi aria	Acala 349	108 F	Coker 100W	Témoin
1/2	2,2	2,1	2,0	1,9	2,3
1	2,3	2,0	1,9	1,5	2,3
1 1/2	2,3	2,0	1,7	1,3	2,3
2	2,3	2,0	1,7	1,2	2,3
2 1/2	2,4	1,9	1,7	1,2	2,3
3	2,4	1,9	1,6	1,2	2,4
3 1/2	2,3	1,9	1,6	1,1	2,3
4	2,4	2,0	1,6	1,2	2,3
4 1/2	2,5	2,1	1,7	1,2	2,3
5	2,5	2,2	1,7	1,3	2,3
5 1/2	2,7	2,3	1,8	1,3	2,3
6	2,7	2,4	1,9	1,4	2,4
6 1/2	2,7	2,5	2,1	1,7	2,4
7	2,8	2,6	2,4	1,8	2,4
7 1/2	2,9	2,7	2,6	2,1	2,3
8	3,0	2,9	2,8	2,4	2,3
8 1/2	3,0	3,0	2,9	2,6	2,3
9	3,1	3,0	3,0	2,8	2,4
9 1/2	3,1	3,0	3,0	2,9	2,3
10	3,1	3,0	3,0	3,1	2,3
10 1/2	3,1	2,9	3,0	3,0	2,3
11	3,0	2,9	3,0	3,1	2,3
13	2,7	2,5	3,0	3,1	2,3
13 1/2	2,5	2,5	3,0	3,1	2,3
14	2,4	2,4	3,0	3,1	2,3
14 1/2	2,3	2,4	2,9	3,1	2,3
15	2,1	2,3	2,9	3,1	2,4
15 1/2	2,0	2,2	2,9	3,1	2,3
19	0,9	2,0	2,9	3,1	2,3
19 1/2	0,9	2,0	2,9	3,1	2,3
20	0,8	2,0	2,9	3,1	2,3
22 1/2	0,7	2,0	2,9	3,2	2,5
23	0,7	2,0	2,8	3,1	2,3
23 1/2	0,7	2,0	2,8	3,1	2,3

III-1-2. Action des exsudats radicellaires des plantules de cotonniers sur la respiration des conidies de V. dahliae.

Les conidies exemptes de mycélium ont un QO_2 faible Etant donné la forte concentration de conidies, aucune germination n'a été observée durant les 24 heures d'incubation. Le tableau 8 montre la variation du QO_2 des conidies en présence des exsudats.

Bien que les valeurs du QO_2 des conidies soient extrêmement faibles, plusieurs faits permettent de considérer les variations observées comme significatives :

1°) Les mesures sont faites avec des masses de conidies de l'ordre de 5mg, ce qui entraîne une consommation d'O_2 mesurée d'environ 12 µl/h dans le cas du témoin.

2°) les valeurs du QO_2 obtenues dans le cas des conidies témoins sont constantes tout au long de l'incubation, alors que celles des autres traitements subissent des variations identiques à celles observées sur le mycélium.

3°) Les variations sont parfaitement reproductibles d'une expérience à l'autre.

Le QO_2 ≠≠ 2,3 des conidies en présence d'air et de glucose, et en absence d'exsudats, représente environ 11 % de la valeur du QO_2 du mycélium incubé dans les mêmes conditions.

Le QO_2 des conidies incubées en présence des exsudats radicellaires des cotonniers suit les mêmes types de courbes que celui du mycélium incubé dans les mêmes conditions. La valeur du

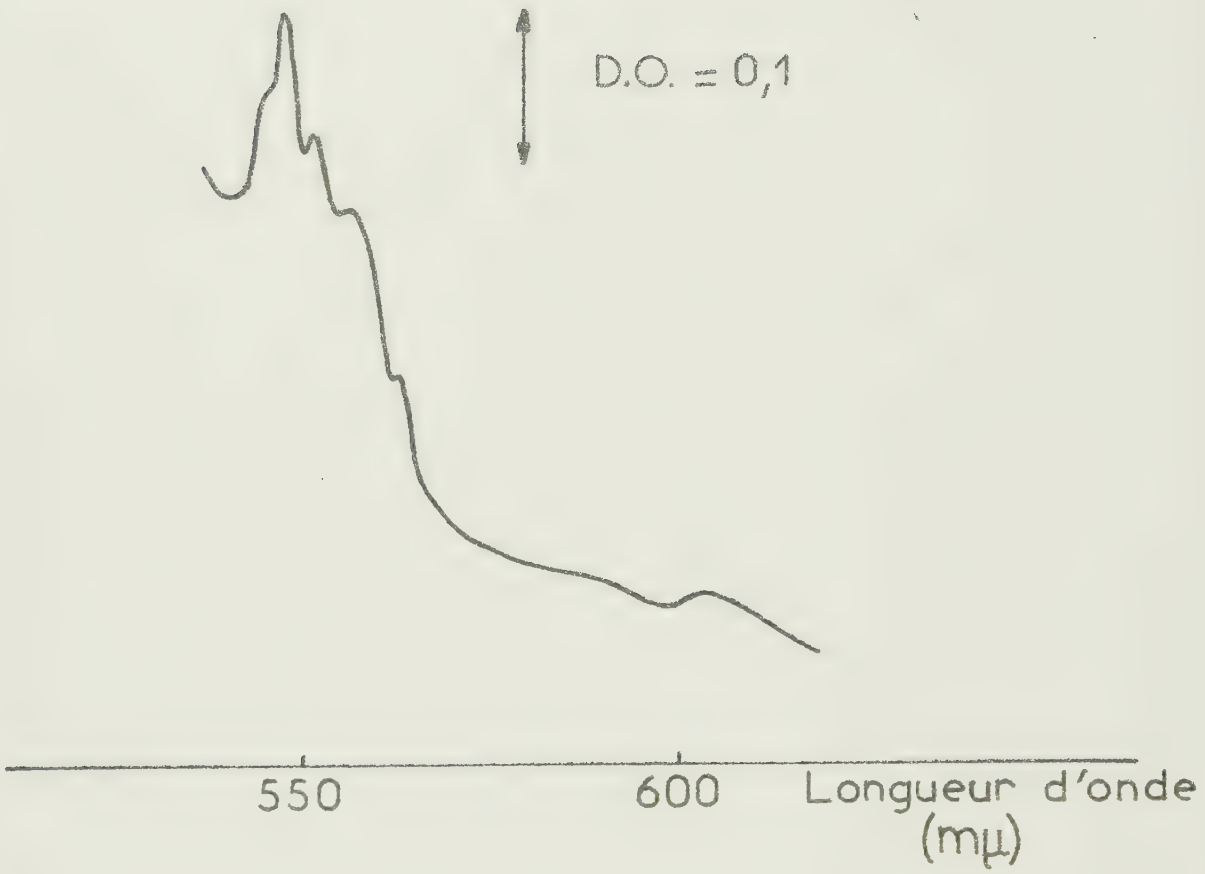


Figure III : Spectre hématinique (à - 190°) de V. dahliae

c_α = 547 mμ, $c_{1\alpha}$ = 552,5 mμ, b_α = 558 mμ

$(a+a_3)_\alpha$ = 603 mμ.

QO_2 des conidies correspondant à chaque point des courbes de la figure 2 est de 10,7 à 11,4 % de la valeur du QO_2 correspondant du mycélium.

Ainsi l'action des exsudats radicellaires des cotonniers est identique sur la respiration du mycélium et des conidies de V. dahliae.

III-1-3. Spectre hématinique de V. dahliae.

La figure 3 montre le spectre d'absorption réalisé à basse température (- 190°C). On remarque la présence des cytochromes de la chaîne respiratoire classique : c_α = 547 mμ ; $c_{1\alpha}$ = 552,5 mμ ; b_α = 558 mμ; $(a+a_3)_\alpha$ = 603 mμ. L'épaulement situé à 545,5 mμ pourrait correspondre à la bande α de l'iso-2-cytochrome c.

On note également la présence d'une bande située à 563 mμ déjà signalée par SHERMAN (1965) ainsi que par OHANIANCE (1967) chez la levure.

Les spectres hématiniques du champignon, cultivé sur un milieu synthétique contenant les exsudats radicellaires des variétés Coker 100 wilt ou Boumi aria (cf. I-4) sont identiques à celui de la figure 3, aucune variation qualitative ou quantitative n'a été observée. Ainsi les exsudats radicellaires des cotonniers sensible, ou résistant n'ont aucune influence sur la biosynthèse des enzymes hématiniques de la chaîne respiratoire classique de V. dahliae.

TABLEAU IX

INFLUENCE DU CYANURE DE POTASSIUM (2.10^{-3}M) SUR LA RESPIRATION DU MYCELIUM DE V. dahliae INCUBE EN ABSENCE (TEMOIN) OU EN PRESENCE DES EXSUDATS RADICELLAIRES DE COTONNIERS SENSIBLE, TOLERANTS ou RESISTANT.

Temps d'incubation heures	QO_2									
	Témoin		Coker 100 W		Boumi aria		Acala 349		108 F	
	-KCN	+KCN	-KCN	+KCN	-KCN	+KCN	-KCN	+KCN	-KCN	+KCN
1 h.	19,6	9,8	14,1	7,4	21,0	10,1	17,1	9,0	17,9	8,9
3 h.	20,1	10,0	10,4	5,1	21,9	10,5	15,3	7,4	18,3	9,0
10h.	20,0	10,4	27,6	13,4	28,8	14,0	26,7	13,5	27,1	14,0
13h.	19,8	10,5	27,9	13,4	6,1	2,9	17,0	8,9	26,1	12,6

La respiration est mesurée en présence de tampon phosphate (0,06 M, pH = 6,3), d'air et de glucose (10^{-2}M).

III-1-4. Mesure de la vitesse de respiration du mycélium de V. dahliae, en présence d'air, de glucose et de quelques inhibiteurs.

Nous avons utilisé : cyanure de potassium ; dicoumarol ; 2,4-dinitrophénol ; gossypol ; scopolétine.

Les mesures ont été faites par la méthode manométrique les conditions sont celles décrites (cf. I-3-2-2). La solution du composé inhibiteur, préparée juste avant l'emploi est ajoutée à la solution de glucose dans le bras latéral des fioles de Warburg.

III-1-4-1. Cyanure de potassium.

Nous avons déterminé dans quelle mesure la respiration du mycélium était sensible au cyanure, et si cette sensibilité subissait une variation au cours de l'incubation du mycélium en présence des exsudats (cf. I-3-2-1).

Ces expériences dont les résultats sont présentés dans le tableau IX montrent que la respiration du mycélium de V. dahliae est inhibée environ de 50 % par le cyanure (2.10^{-3}M).

L'inhibition de la respiration reste constante (50%) pendant toute la durée de l'incubation du mycélium en présence des différents exsudats.

Notons que la même concentration de cyanure a entraîné une inhibition de 80 % de la respiration de Saccharomyces cerevisiae (levure de boulangerie). Pour obtenir des inhibitions de cet ordre chez le Verticillium il faut utiliser une concentration de 10^{-2}M, à cette concentration l'inhibition par le

TABLEAU X

INFLUENCE DU 2-4-DINITROPHENOL SUR LA RESPIRATION DU MYCELIUM DE V. DAHLIAE INCUBE EN ABSENCE (TEMOIN) OU EN PRESENCE DES EXSUDATS RADICELLAIRES DU COTONNIER BOUMI-ARIA.

Temps d'incubation (heures)	QO_2							
	Témoin				"Exsudats Boumi-aria"			
	+ 2.4-DNP				+ 2.4-DNP			
	0	10^{-4} M	10^{-5}M	10^{-6}M	0	10^{-4}M	10^{-5}M	10^{-6}M
1	20,2	14,8	18,1	19,0	21,0	15,1	18,0	20,1
3	20,3	15,1	17,9	18,4	21,8	16,8	19,7	21,2
10	20,2	14,9	18,1	18,9	28,7	21,9	26,0	28,1
23	20,4	15,0	16,7	19,2	6,7	4,3	5,5	6,4

La respiration est mesurée en tampon phosphate 0,06 M, pH = 6,3 en présence d'air et de glucose (10^{-2}M).

cyanure n'est plus spécifique de la cytochrome-oxydase.

La comparaison de l'inhibition observée chez V. dahliae et la levure laisse supposer qu'au moins 30 % de la consommation d'oxygène du V. dahliae passe par une autre voie que la chaîne respiratoire classique.

III-1-4-2. 2,4-dinitrophénol (DNP).

Le tableau X montre l'action du DNP sur la respiration du mycélium incubé seul ou en présence des exsudats radicellaires de la variété Boumi aria.

Nous ne mettons pas en évidence d'effet stimulateur du DNP sur la respiration, mais nous observons qu'à la concentration 10^{-4}M il exerce un effet inhibiteur (environ 25 % d'inhibition).

BECHTOL et coll. (1966) signalent une stimulation de la respiration des conidies de V. albo-atrum sous l'effet du DNP (pH = 7). MALCA et coll. (1968) montrent que l'action du DNP varie non seulement suivant sa concentration et le pH mais aussi suivant la souche de V. albo-atrum "microsclérotial type" utilisée. Une souche entrainant la défoliation du cotonnier utilisée par ces auteurs est plus sensible à l'effet inhibiteur du DNP qu'une autre souche non défoliante. A ce propos, signalons que notre souche de V. dahliae entraîne le rabougrissement, le flétrissement et la défoliation du cotonnier (CAUQUIL et coll. (1964)).

TABLEAU XI

RESPIRATION DU MYCELIUM DE V. DAHLIAE INCUBE EN PRESENCE DE DICOUMAROL, DE GOSSYPOL OU DE SCOPOLETINE.

Temps d'incubation (heures)	QO_2			
	Témoin	+ DICOUMAROL 10^{-4}M	+ GOSSYPOL 5.10^{-4}M	+ SCOPOLETINE 10^{-5}M
1	19,8	7,0	17,8	19,6
3	20,1	7,1	18,0	19,9
10	19,9	6,2	14,6	23,8
23	20,3	3,5	10,0	16,1

La respiration est mesurée en tampon phosphate 0,06 M, pH = 6,3 en présence d'air et de glucose (10^{-2}M).

III-1-4-3. Dicoumarol - gossypol - scopolétine.

Le mycélium est incubé, dans le tampon phosphate 0,06 M (pH = 6,3) (cf. I-3-2-1) en présence des inhibiteurs aux concentrations indiquées.

Le tableau XI montre l'action de ces inhibiteurs sur la respiration du mycélium en présence d'air et de glucose (10^{-2}M).

III-1-4-3-1. Dicoumarol.

A la concentration 10^{-4}M, il est un puissant inhibiteur de la respiration du mycélium de V. dahliae : inhibition d'environ 70 % durant les 10 premières heures et de 85 % après 22 h. d'incubation.

Notons que THRONNEBERRY (1967) montre une faible inhibition de l'activité NADH et NADPH-cytochrome c réductase des fractions subcellulaires des conidies de V. albo-atrum sous l'action de dicoumarol (10^{-4}M) et pense qu'un intermédiaire de la vitamine K participerait au système respiratoire du champignon

III-1-4-3-2. Gossypol.

Le gossypol (1,1' , 6,6' , 7,7'-hexahydroxy-5,5'-diisopropyle-3,3'-diméthyle (2,2'-binaphtalène)-8,8'-dicarboxaldéhyde), pigment prépondérant du cotonnier, est largement distribué sur la plante dans des glandes spécifiques. Ce pigment également présent dans les graines de cotonnier a fait l'objet de nombreuses recherches du fait de sa toxicité pour les

animaux (ADAMS et coll. (1960)). BELL (1967) montre l'accumulation du gossypol dans les capsules et vaisseaux conducteurs du cotonnier infecté par Verticillium albo-atrum et pense que cette substance intervient dans la résistance active de la plante et lui attribue même un rôle de phytoalexine. De plus, MYERS et coll. (1966) mettent en évidence l'action inhibitrice du gossypol sur certains enzymes du système respiratoire. Ces considérations nous ont poussés à rechercher la présence du gossypol dans les exsudats radicellaires et de voir quelle était son action sur la respiration de V. dahliae.

Malgré les concentrations importantes d'exsudats (cf. I-7-3-2) utilisées l'analyse chromatographique n'a pas révélé la présence du gossypol dans les exsudats des 4 variétés considérées.

En ce qui concerne l'action du gossypol (concentration 5.10^{-4}M) sur la respiration de V. dahliae on constate une inhibition de plus en plus importante au fur et à mesure que se poursuit l'incubation.

III-1-4-3-3. Scopolétine.

La scopoline, β-glycoside de la scopolétine, a été caractérisée dans les exsudats radicellaires des variétés Acala 349 et surtout Boumi aria. Elle est utilisée à la concentration 10^{-5}M. Sans aucune action durant les 3 premières heures de l'incubation, la scopolétine stimule d'environ 20 % la respiration du mycélium de V. dahliae après 10 h., tandis qu'on

TABLEAU XII

INFLUENCE DES EXTRAITS PHENOLIQUES DES EXSUDATS RADICELLAIRES DE COTONNIERS SENSIBLE, TOLERANTS ET RESISTANT SUR LA RESPIRATION DU MYCELIUM DE V. DAHLIAE INCUBE EN LEUR PRESENCE.

Temps d'incubation (heures)	QO_2				
	Témoin sans extrait	+Extrait Coker 100W	+ Extrait 108 F	+ Extrait Acala 349	+ Extrait Boumi aria
1	20,1	19,9	20,3	20,0	19,8
3	20,0	20,1	20,1	19,9	19,3
10	20,2	20,0	19,9	19,6	17,1
23	20,1	20,3	20,0	17,9	15,2

La respiration est mesurée en tampon phosphate 0,06 M, pH = 6,3, en présence d'air et de glucose (10^{-2}M).

TABLEAU XIII

GERMINATION DES CONIDIES DE V. DAHLIAE EN PRESENCE DES EXSUDATS DES DIFFERENTES VARIETES DE COTONNIERS.

Durée de l'incubation	% de germination des Conidies				
	Témoin	Coker 100W	Acala 349	108 F	Boumi aria
6 h	13,0	17,6	9,5	11,0	9,6
18 h	43,2	50,1	34,8	32,1	30,7
24 h	50,0	58,3	35,5	34,8	35,2

Chaque chiffre représente la moyenne de 4 expériences intéressant chacune 200 conidies.

observe une inhibition de 20 % après 23 h. d'incubation.
Ces résultats montrent une certaine similitude entre l'action de la scopolétine et celle des exsudats des variétés Boumi aria et Acala 349 sur le mycélium de V. dahliae.

III-1-5. Action des extraits à l'acétate d'éthyle des exsudats radicellaires de cotonniers sur la respiration du mycélium de V. dahliae incubé en leur présence.

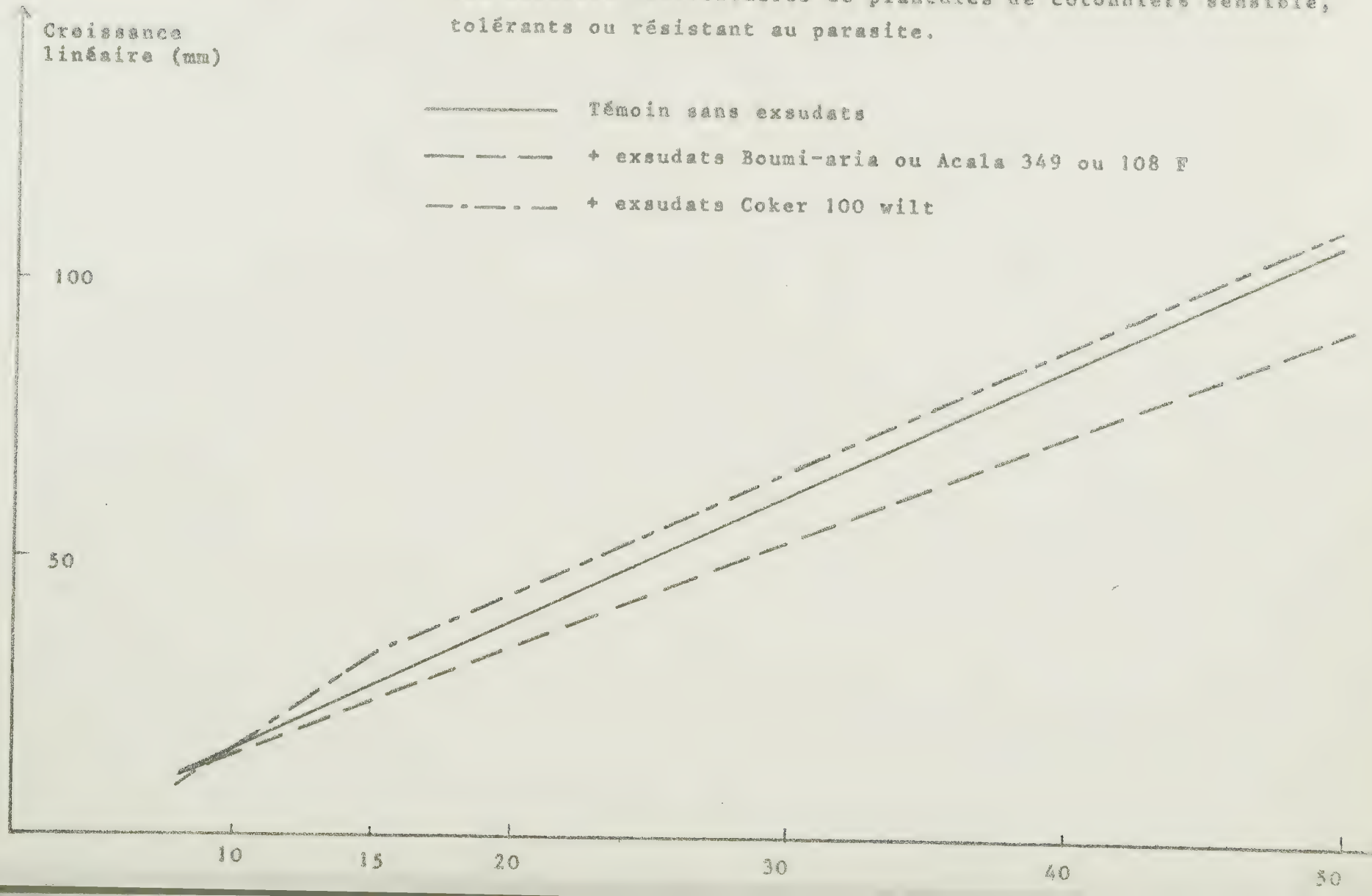
Le mycélium est incubé (cf. I-3-2-1) en présence des extraits à l'acétate d'éthyle contenant les composés phénoliques des exsudats (cf. I-7-3-1-2). La concentration finale des extraits est calculée de façon qu'elle corresponde à la concentration = 1 des exsudats.

Le tableau 12 montre les résultats obtenus.

L'extrait à l'acétate d'éthyle des exsudats radicellaires des variétés Coker 100 W. et 108 F n'ont aucune action sur la respiration du mycélium, tandis que celui de la variété Boumi aria entraîne une inhibition d'environ 15 % après 10 h. et de 25 % après 23 h. d'incubation. Une inhibition d'environ 10 % est observée dans le cas de la variété Acala 349, seulement après 23 h. d'incubation.

III-1-6. Influence des exsudats radicellaires de différentes variétés de cotonniers sur la germination des conidies et la croissance linéaire de V. dahliae.

Figure IV - Croissance linéaire de V. dahliae sur milieu gélosé contenant les exsudats radicellaires de plantules de cotonniers sensible, tolérants ou résistant au parasite.



III-1-6-1. Germination des conidies.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XIII. On remarque que :

1°) Les exsudats des deux variétés tolérantes et de la variété résistante inhibent dans une certaine mesure la germination des conidies de V. dahliae par rapport au témoin. Cette inhibition est presque identique pour les trois variétés (30 % après 24 h. d'incubation).

2°) Les exsudats de la variété sensible stimulent la germination des conidies de V. dahliae. La stimulation est environ de 16 % après 18 et 24 h. d'incubation.

III-1-6-2. Croissance linéaire.

La figure 4 montre que :

- les vitesses de croissance linéaire du champignon incubé en présence des exsudats des deux variétés tolérantes ou de la variété résistante sont identiques. La croissance est légèrement inhibée par rapport au témoin.

- la vitesse de croissance du champignon incubé en présence des exsudats de la variété sensible est plus élevée que celle du témoin pendant les 15 premiers jours de l'incubation, par la suite elle devient égale à celle du témoin.

TABLEAU XIV

TENEUR EN ACIDES AMINES DES EXSUDATS RADICELLAIRES DES DIFFERENTES VARIETES DE COTONNIERS

Variétés de Cotonnier	Teneur en acides aminés													
	SER	Ac. GLU	GLY	ARG	Ac. ASP	LYS	LEU+ ISO	VAL	ALA	SAR	PRO	THR	ASP	PHE
Coker 100 Wilt	++	++	+++	++++	++	+	++++	++++	++	++	+	+++	++	-
108 F	+	+	++	++	+	+	+	-	+	-	+	-	+++	-
Acala 349	+	+++	+	++	++++	+	+	+	-	-	-	-	++	-
Bouni aria	+	+	++	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+

Chromatographie sur couche mince (DEAE-Cellulose -Cellulose)
++++ taches très étendues fortement colorées
+++ taches étendues fortement colorées
++ taches moyennement étendues moyennement colorées
+ taches peu étendues faiblement colorées.
Ser = Sérine ; Ac. GLU = acide glutamique ; GLY = glycine ; ARG = arginine ; Ac. ASP = acide aspartique ; LYS = lysine ; LEU + ISO = leucine et isoleucine ; VAL = valine ; ALA = Alanine ; SAR = sarcosine ; PRO = proline ; THR = thréonine ; ASP = asparagine ; PHE = phénylalanine.

III-2. ANALYSES DES EXSUDATS RADICELLAIRES DE PLANTULES DE COTONNIERS SENSIBLE, TOLERANTS OU RESISTANT AU V. dahliae.

III-2-1. Acides aminés.

Les résultats sont présentés dans le tableau XIV. On remarque que :

1°) La teneur et la composition des acides aminés présents dans les exsudats radicellaires varient suivant la résistance des cotonniers. Ceux de la variété sensible sont plus riches que ceux des variétés tolérantes qui à leur tour l'emportent sur ceux de la variété résistante.

2°) La phénylalanine, qui entre dans l'une des voies de la biosynthèse des composés phénoliques, n'existe en quantité détectable que dans les exsudats de la variété résistante.

3°) Sérine - acide glutamique - glycine - arginine - acide aspartique et leucine + isoleucine sont présents dans les exsudats des 4 variétés.

III-2-2. Composés phénoliques.

III-2-2-1. Le tableau XV rapporte les résultats observés dans le cas de développement des chromatogrammes avec le solvant : butanol - acide acétique - eau (8-2-2). Les Rf des taches observées dans le cas d'utilisation du solvant : Butanol saturé d'ammoniaque 4N sont : 0,06 ; 0,15 ; 0,46 ; 0,58 ; 0,78 et 0,93.

1 - La richesse en composés phénoliques des exsudats est en corrélation directe avec le degré de résistance des cotonniers au V. dahliae.

TABLEAU XV

COMPOSES PHENOLIQUES DANS LES EXSUDATS RADICELLAIRES DES DIFFERENTES VARIETES DE COTONNIERS

Rf / Variétés	0,06	0,17	0,21	0,37	0,53	0,88
Coker 100 Wilt	-	-	-	-	-	-
108 F	-	+	+	-	-	-
Acala 349	-	-	++	+	+	-
Boumi aria	+	+	++	+	+++	++

Extraction des composés phénoliques (cf. I-7-3-1).

Chromatographie ascendante sur papier (Whatman n° 1)

Solvant : Butanol - Acide acétique - eau (8 - 2 - 2 v/v)

Concentration des exsudats = 100

Même notation que pour le tableau XIV.

2 - D'après les caractères de fluorescence, la composé phénolique de Rf = 0,53 (chromatogramme développé dans le solvant Butanol - acide acétique - eau) ou de Rf = 0,46 (chromatogramme développé dans le solvant Butanol saturé d'ammoniaque) semblait être de la scopoline (OZERECKOVSKAJA et coll. (1966) ; HARBORNE (1960)).

La scopoline, β-glucoside de la scopolétine (6-méthyoxy-7-hydroxycoumarine), est une substance synthétisée dans la plante à partir de la phénylalanine (REID (1958)). L'aglycone scopolétine dérive de la scopoline (SKOOG et coll. (1961)), il a été signalé chez certaines plantes (MORS (1957), HARBORNE (1960), SARGENT et coll. (1961), EBERHARDT (1954)). La balance scopoline-scopolétine est sous la dépendance du système auxine-kinétine de la plante (SKOOG et coll. (1961)).

En dehors de son action inhibitrice sur la croissance et la formation des racines (LIBBERT et coll. (1960)), l'ensemble scopoline-scopolétine semble jouer un certain rôle dans la résistance des plantes. Ainsi BEST (1944), ANDEAE (1948), URITANI (1953), URITANI et coll. (1953), MARTIN (1958 a et b), HUGHES et coll. (1960), BONIFACIO et coll. (1961), MAYR et coll. (1963) notent l'apparition ou l'augmentation du taux de l'une ou l'autre de ces substances chez les plantes infectées ou lésées. Plus particulièrement, OZERECKOVSKAJA et coll. (1966) signalent l'apparition de la scopoline chez les cotonniers tolérants, infectés par V. dahliae. L'on pourrait rapprocher de ces résultats les nouvelles méthodes de détection de la

résistance du cotonnier au Verticillium basées sur la fluorescence en U.V. des tissus infectés, récemment mises au point en U.R.S.S. (METLITSKII et coll. (1966), LANETSKII et coll. (1968)).

Pour vérifier l'existence de la scopoline dans les exsudats, nous avons utilisé une technique qui permet de scinder la scopoline en glucose et scopolétine, cette dernière pouvant être caractérisée par comparaison avec la scopolétine du commerce (x).

- 100 µl d'extrait phénolique (cf. I-7-3-1-2) sont déposés sur papier Whatman n°1.
- 100 µl d'une solution aqueuse contenant 10 mg/ml de β-glucosidase sont déposés sur le dépôt d'extrait phénolique.
- Le chromatogramme est suspendu pendant 48 heures dans une enceinte fermée saturée de vapeur d'eau à 40°C. Le papier est ensuite séché et une chromatographie ascendante (cf. I-7-3-1) est effectuée.

Le développement du chromatogramme dans le solvant : Butanol - acide acétique - eau (6-2-2) révèle entre autre une tache de Rf = 0,83 et la tache de Rf = 0,53, correspondant à la scopoline n'apparaît plus.

Sur les chromatogrammes développés avec le solvant : Butanol saturé d'ammoniaque 4N, on révèle une tache de Rf=0,37 et celle de Rf = 0,46 n'apparaît plus.

III-2-2-2. Recherche du gossypol dans les exsudats.

(cf. III-1-4-3-2).

x La β-glucosidase et la scopolétine nous ont été aimablement communiquées respectivement par M. METCHE (Faculté des Sciences de Nancy) et M. PELT (Faculté de Pharmacie de Nancy). Qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

III-3. DISCUSSION ET CONCLUSION.

Les expériences décrites montrent que la respiration, la germination des conidies et la croissance linéaire du V. dahliae subissent des variations sous l'influence des exsudats radicellaires des cotonniers. Les effets observés sont différents suivant que les exsudats proviennent des variétés sensible, tolérantes ou résistante à l'agent du wilt.

Respiration

L'influence des exsudats sur la respiration est identique dans le cas du mycélium ou des conidies.

Dans chacun des cas (mycélium ou conidies), le QO_2 passe par un même maximum, environ après 10 h. d'incubation. L'évolution de QO_2 avant et après 10 h. d'incubation reste toujours en corrélation avec le degré de la résistance du cotonnier à V. dahliae.

Nos résultats concernant l'action des exsudats sur la respiration de V. dahliae sont à rapprocher de ceux de MIRPULATOVA (1961) qui rapporte que l'activité des enzymes du système respiratoire de V. dahliae varie après passage de celui-ci sur des variétés de cotonnier plus ou moins résistantes au parasite.

Les résultats de l'inhibition par le cyanure laissent supposer que la consommation d'oxygène du Verticillium se fait au moins par deux voies différentes ; l'une passerait par la chaîne respiratoire classique, sensible au cyanure, l'autre

par une autre voie insensible au cyanure. L'existence d'une chaîne respiratoire différente de celle passant par les cytochromes a été envisagée par DARBY et coll. (1950 b), GRIMM et coll. (1954), COCHRANE (1958) chez d'autres champignons.

Le spectre hématinique du V. dahliae révèle la présence des cytochromes de la chaîne respiratoire classique : c, c_1, b, $(a+a_3)$; un spectre analogue a été décrit chez de nombreux genres et espèces de champignons par BOULTER et coll. (1957). Les voies du métabolisme oxydatif de Verticillium albo-atrum ont fait l'objet de quelques études (BRANDT et coll. (1960), THRONNEBERRY et coll. (1965), BECHTOL et coll. (1966), THRONNEBERRY (1967), MALCA et coll. (1968)) qui n'ont pas conduit jusqu'ici à l'établissement d'un schéma de la chaîne des transporteurs d'électrons chez ce microorganisme.

L'inhibition du QO_2 par les exsudats des variétés sensible et tolérantes, et la stimulation par l'exsudat de la variété résistante durant les premières heures de l'incubation sont difficiles à interpréter.

Dans le cas de la stimulation par les exsudats de la variété résistante, il était concevable de supposer l'existence d'un découplage de la phosphorylation oxydative. Toutefois, l'utilisation de découplants tels que 2,4-dinitrophénol et dicoumarol n'ont pas permis de mettre en évidence un tel effet, en revanche, on observe l'effet inhibiteur de ces substances sur la respiration de V. dahliae. MALCA et coll. (1968) rapportent l'effet inhibiteur de 2,4-dinitrophénol sur la respiration

des conidies de certaines souches de V. albo-atrum et constatent que cet effet dépend de la souche de Verticillium utilisée.

Rôle éventuel des acides aminés.

Une corrélation entre la quantité d'acides aminés exsudée par les racines de différentes variétés de tomates et leur résistance au Rhizoctonia solani a été observée par NOUR-EL-DEIN et coll. (1964) ; de même SULOCHANA (1962) montre l'existence d'une relation entre la quantité de cystine exsudée par les racines de cotonniers et leur résistance au "wilt" causé par Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum. Signalons toutefois que les travaux de SUBBA-RAO et coll. (1961) sur les exsudats des variétés de tomates ayant des degrés de résistance différents au Verticillium albo-atrum ne sont pas en accord avec ceux de NOUR-EL-DEIN (Loc. cit.). De même SCHNATHORST et coll. (1964-1965) n'observent pas de corrélation entre la teneur en acides aminés des fluides trachéaux de cotonniers et leur degré de tolérance au V. albo-atrum.

Comme d'autre part, BECHTOL et coll. (1966) observent que la respiration du V. albo-atrum est stimulée par certains acides aminés, nous avons entrepris l'analyse des acides aminés des exsudats radicellaires des 4 variétés de cotonniers.

Ces analyses mettent en évidence une corrélation entre la quantité d'acides aminés présents dans les exsudats des cotonniers et leur sensibilité au V. dahliae. La richesse en acides aminés des exsudats diminue au fur et à mesure que la résistance du cotonnier à l'agent du "wilt" augmente.

Ainsi la présence des acides aminés en quantité plus importante dans les exsudats des variétés Coker 100 wilt et 108 F pourrait expliquer, dans une certaine mesure, les valeurs élevées du QO_2, après la dizième heure de l'incubation en présence de ces exsudats.

Rôle éventuel des composés phénoliques.

Les composés phénoliques jouent un rôle prépondérant dans la résistance des plantes aux maladies (RUBIN et coll. (1951-1963-1964), WALKER et coll. (1955), DIMOND (1955), KUC et coll. (1956), FARKAS et coll. (1962), TOMIYAMA (1963), BABAEV (1964), PATIL et coll. (1964), BECKMAN (1964), KUC (1964), BERG (1964), ALLEN (1966), HARE (1966), LEWIS et coll. (1967), BLOSS et coll. (1967), SOMERS et coll. (1967), ROHRINGER et coll. (1967). En particulier chez le cotonnier, il semble que les variétés résistantes au V. dahliae soient plus riches en composés phénoliques que les sensibles (AVETISYAN (1960), BABAEV et coll. (1964)). D'autre part, les composés phénoliques semblent inhiber l'activité ou réduire la synthèse de certains enzymes du V. albo-atrum (PATIL et coll. (1967 - 1968)).

Il était donc possible que l'inhibition de la respiration observée après la dizième heure d'incubation en présence des exsudats des variétés Boumi-aria et Acala 349 soient due à la présence des composés phénoliques dans ces exsudats. Il nous a donc semblé nécessaire de déterminer la richesse en composés phénoliques des exsudats radicellaires et de voir l'action des

extraits phénoliques des exsudats sur la respiration de V. dahliae.

Les résultats des analyses effectuées montrent que la variété résistante exsude des quantités plus importantes de composés phénoliques que les variétés tolérantes ; alors que ces composés ne sont pas décelables dans les exsudats de la variété sensible.

Les extraits contenant les composés phénoliques des exsudats de la variété Boumi-aria et Acala 349, inhibent la respiration du V. dahliae après 23 heures d'incubation. Les inhibitions observées n'atteignent pas l'ampleur de celles obtenues avec les exsudats entiers.

Nous avons déjà mentionné que le composé phénolique le plus abondant dans les exsudats de la variété résistante est la scopoline, β-glucoside de la scopolétine. On sait que V. albo-atrum possède de la β-glucosidase (GUBANOV (1962), GUBANOV et coll. (1965)) qui scinde les β-glucosides en aglycone et glucose. Ainsi, V. dahliae transformerait, dans les exsudats, la scopoline en scopolétine ; c'est pourquoi nous avons déterminé l'action de cette dernière sur la respiration de V. dahliae et nous avons constaté qu'il existe une certaine analogie entre l'action de la scopolétine et celle des exsudats des variétés Boumi-aria et Acala 349.

Le gossypol inhibiteur de la respiration de V. dahliae (cf. III-1-4-3-2) n'a pu être détecté dans aucun des exsudats.

En conclusion il semble que l'action des exsudats radicellaires de cotonniers sur la respiration du V. dahliae

n'est pas due à une substance unique mais plutôt le résultat d'interactions de plusieurs composés, les uns stimulants, les autres inhibiteurs, parmi lesquels les acides aminés et les composés phénoliques, en particulier la scopoline, doivent intervenir.

Germination des conidies et croissance mycélienne.

La germination des conidies et la croissance mycélienne sont inhibées d'une façon identique par les exsudats des variétés résistantes et tolérantes, tandis qu'elles sont stimulées par les exsudats de la variété sensible. Le fait que nous obtenions un pourcentage de germination de conidies assez faible (50 % après 24 h.) peut être dû à l'utilisation de tampon phosphate comme milieu d'incubation (HUBBES et coll. (1967)).

La stimulation de la germination et de la croissance mycélienne par les exsudats de la variété sensible pourrait être attribuée à la richesse en acides aminés de ceux-ci.

En effet, l'influence des acides aminés ainsi que ceux d'autres substrats exogènes sur la germination des conidies et la croissance mycélienne des champignons ont fait l'objet de nombreux travaux et revues (LE TOURNEAU (1957), COCHRANE (1958-1960-1966), CEZARD (1961), DIAZ POLANCO et coll. (1964), SCHROTH et coll. (1964), POPOVA (1964), NOUR-EL-DEIN et coll. (1964), ROVIRA (1965), POWELSON (1966), MALCA et coll. (1966), CHRISTIE (1966), SUSSMAN (1966), VAN ANDEL (1966)). D'après SCHREIBER et

coll. (1963) c'est la fraction contenant les acides aminés des exsudats de l'hôte sensible qui est surtout responsable de la levée de la fungistase du sol et par suite de la germination des conidies et des microsclérotes de V. albo-atrum. SCHNATHORST et coll. (1965) signalent une stimulation de la germination en présence de certains acides aminés et notent que la composition du milieu et les conditions de cultures du V. albo-atrum jouent ultérieurement un rôle dans le potentiel de germination de ses conidies.

Nos observations de l'effet inhibiteur des exsudats des variétés tolérantes et résistante sur la germination des conidies et la croissance mycélienne sont à rapprocher des résultats de CARNS et coll. (1964) qui constatent une inhibition de la germination des conidies et de la croissance mycélienne du V. albo-atrum en présence des exsudats foliaires de cotonnier tolérant au parasite. De même l'inhibition de la croissance de V. dahliae incubé en présence de la sève de cotonnier tolérant a été observé par KOUBLANOVSKAJA et coll. (1954).

L'ensemble de nos résultats met en évidence une corrélation entre le degré de résistance des cotonniers au V. dahliae et :

1°) la richesse en acides aminés et en composés phénoliques des exsudats radicellaires des plantules ;

2°) l'action des exsudats radicellaires sur la respiration, la germination des conidies et la croissance mycélienne du parasite.

Si la respiration de la plante-hôte infectée par le parasite a fait l'objet de nombreux travaux (FARKAS et coll. (1958-1965), RUBIN et coll. (1963-1967), WALKER (1962), TOMIYAMA (1963), BECKMAN (1964), URITANI (1965), SADASIVAN (1965), YARWOOD (1967)) la respiration du parasite au contact des substances métabolisées par la plante hôte n'avait jamais été prise en considération à notre connaissance.

De même que l'agent pathogène engendre des perturbations dans les systèmes oxydatifs de l'hôte il apparaît, d'après nos résultats, que les substances exsudées par ce dernier agissent à leur tour sur le système oxydatif du parasite.

Dans le phénomène de la résistance un rôle important a été attribué au processus respiratoire de la plante ; les résultats que nous obtenons laissent supposer qu'une aussi grande importance pourrait être attribuée aux variations du métabolisme oxydatif du parasite sous l'influence des substances élaborées par l'hôte.

La baisse de l'activité respiratoire du parasite s'accompagne d'une baisse des composés fournisseurs d'énergie nécessaire aux processus de synthèse chez le parasite. Ainsi via l'inhibition des oxydations, le mécanisme de synthèse d'autres systèmes enzymatiques nécessaires à la pathogénicité du parasite (par exemple les enzymes pectiques (FARKAS et coll. 1958, KAMAL et coll. 1956, DEESE et coll. 1960, LEAL 1962, BROWN 1965, STAHMAN 1965, MAHADEVAN et coll. 1965, BATEMAN et coll. 1966, WIES et coll. 1968, MUSSELL et coll. 1968)) peut être affecté.

Bien entendu, il n'est pas exclu que certaines substances présentes dans les exsudats puissent inhiber directement des systèmes enzymatiques autres que le système respiratoire (par exemple certains phénols inhibent l'activité du polygalacturonase (PATIL et coll. 1967-1968) du Verticillium).

De nombreux auteurs pensent aujourd'hui que les mécanismes de résistance aux parasites sont principalement des processus actifs mis en place en réponse à l'infection, ou au moins suscités par la rencontre de la plante avec un organisme incompatible.

Nos observations laissent supposer que des phénomènes de résistance passive pourraient également intervenir. Bien qu'il soit difficile de transposer les résultats obtenus dans un milieu aseptique, au milieu extraordinairement complexe qu'est la terre, les différences qualitatives et quantitatives en acides aminés et en composés phénoliques des exsudats radicellaires peuvent sans aucun doute influer sur l'équilibre des organismes se développant dans la rhizosphère et, même sans l'intervention d'autres phénomènes plus complexes, pourraient, dans une certaine mesure, déterminer la susceptibilité et la résistance des cotonniers au V. dahliae.

De plus, les altérations métaboliques provoquées chez le parasite par les exsudats peuvent influencer le comportement de celui-ci vis-à-vis des actions compétitives intenses auxquelles il est soumis à la surface de la racine.

BIBLIOGRAPHIE

ABRAMS E. - 1950. Microbial deterioration. of cellulose during the first 72 hours of attack. Text. Res. J., 20 : 71-86.

ADAMS R., GEISSMAN T.A. et EDWARDS J.D. - 1960. Gossypol, a pigment of cottonseed. Chem. Rev. 60 : 555-574.

ALEXANDER J.V., BOURRET J.A., GOLD A.H. et SNYDER W.C. - 1966. Induction of chlamydospore formation by *Fusarium solani* in sterile soil extracts. Phytopathology, 56 : 353-354.

ALLEN P.J. - 1966. Physiology and biochemistry of defense. Dans Plant Pathology : An Advanced Treatise. HORSFALL J. et DIMOND A.E., Academic Press, London. Vol. 1 : 674 pp. ; p. 435-467.

ALLEN R.M. - 1951. Cotton seeds are capable of carrying *Verticillium*. Pl. Dis. Reptr., 35 : 11-12.

ANDEAE W.A. - 1948. The isolation of a blue fluorescent compound from Green Mountain potato tubers infected with leaf roll virus. Can. J. Res., 26 C : 31.

ARMSTRONG G.M. et ARMSTRONG J.K. - 1965. Further studies on the pathogenicity of three forms of *Fusarium oxysporum* causing wilt of Alfalfa. Pl. Dis. Reptr., 49 : 412-416.

ARNDT C.H. et CHRISTIE J.R. - 1937. The comparative role of certain nematodes and Fundi in the etiology of damping-off or sore shin of Cotton. Phytopathology, 27 : 569-572.

ARNDT C.H. - 1945. Viability and infection of light and heavy cotton seeds. Phytopathology, 35 : 747-753.

ARNDT C.H. - 1946. Effect of Storage conditions on survival of *Colletotrichum gossypii*. Phytopathology, 36 : 24-29.

ARNDT C.H. - 1957. Temperature as a factor in the infection of cotton seedlings by ten pathogens. Pl. Dis. Reptr., 15 : 63-84.

ASHOUR W.A. - 1956-1957. Effect of watering treatment-seed treatment and date of sowing on emergence and damping-off of cotton seeds. Damping-off disease of cotton. 1-Studies on the causal organisms and their pathogenicity. Ann. Agric. Sci. Cairo, 1-2 : 161-176 et 21 : 81-94.

AVETISYAN A.D. - 1960. On tannins, carbohydrates and carbohydrases of cotton in relation to wilt resistance (Russe). Izv. Akad. Nauk. Armyan. S.S.R. Biol. Sci., 13 : 35-45. (D'après Rev. Appl. Mycol., 40 : 417 (1961).

BABAEV F.A. - 1964. Role of tannic substances in the resistance of cotton vars. to *Verticillium* wilt. Dans Materialy vsesoyuznogo simpoziuma po bor'be s viltom Khlopchatnika, 240 pp. Tashkent, Izdat. "Uzbekistan" (1964) : 63-66. (D'après Rev. Appl. Mycol., 45 : 806 (1966)).

BABAEV F.A. et BAGIROV M.M. - 1964. Vilt i dubil'nye veshchestva. Zashch. Rast. Moskva, 9 : 56. (D'après Rev. Appl. Mycol. 44 : 141 (1965)).

BAIN D.C. - 1939. Effect of sulphuric acid treatment on fungi and bacteria present on cotton seed from diseased bolls. Phytopathology, 29 : 879-884.

BATEMAN D.F. et MILLAR R.L. - 1966. Pectic enzymes in tissue degradation. Ann. Rev. Phytopathol., 4 : 119-146.

BECHTOL M.K. et THRONEBERRY G.O. - 1966. Characteristics of respiration by conidia of *Verticillium albo-atrum*. Phytopathology, 56 : 963-966.

BECKMAN C.H. - 1964. Host responses to vascular infection. Ann. Rev. Phytopathol., 2 : 231-251.

BELL A.A. - 1967. Formation of gossypol in infected or chemically irritated tissues of *Gossypium* species. Phytopathology, 57 : 759-764.

BERG W. - 1964. Wechselwirkungen zwischen parasit und wirt bei tracheomykosen. Beitr. Biol. Pflanzen, 40 : 389-449.

BEST R.J. - 1944. Studies on the fluorescent substance present in plants. 2. Isolation of the substance in a pure state and its identification as 6-methoxy-7-hydroxy-benzopyrone. Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci., 23 : 251-255.

BLOSS H.E. et GRIES G.A. - 1967. Physiologic responses of resistant and susceptible root tissues infected with *Phymatotrichum omnivorum*. Phytopathology, 57 : 380-384.

BLUMENTHAL H.J. - 1963. Endogenous metabolism of filamentous fungi. Ann. N.Y. Acad. Sci., 102 : 688-706.

BONDAROVITCH M. Ya. - 1961. Nigrosporoz khlopchatnika i mery protiv nego. Zashch. Rast. Moskva, 6 : 9-27-28. (D'après Rev. Appl. Mycol., 41 : 306 (1962)).

BONIFACIO A. et GUDIN Cl. - 1961. Dépistage sous lampe de Wood des lésions causées par les champignons phytopathogènes. C.R. Acad. Agric. Fr., 47 : 151-152.

BOULLARD B. - 1966. Interactions nutritionnelles plantes-champignons dans le sol. Ann. Inst. Pasteur. Suppl. Sept. 1966, 111 . 267-289.

BOULTER D. et DERBYSHIRE - 1957. Cytochromes of fungi. J. Exp. Bot.,8 : 313-318.

BRACKER C.E. Jr et BUTLER E.E. - 1963. The ultrastructure and development of septa in hyphae of *Rhizoctonia solani*. Mycologia, 55 : 35-58.

BRANDT W.H. et WANG C.H. - 1960. Catobolism of C^{14}-labelled glucose, gluconate and acetate in *Verticillium albo-atrum*. Am. J. Bot., 47 : 50-53.

BROWN W. - 1965. Toxins and cell-wall dissolving enzymes in relation to plant disease. Ann. Rev. Phytopath., 3:1-18.

BUGNICOURT -1939. Les *Fusarium* et *Cylindrocarpon* de l'Indochine. Paul Lechevalier, Editeur, 206 pp.

BUXTON E.W. - 1957. Some effects of pea root exudates on physiologic races of *Fusarium oxysporum* Fr. *f. pisi* (Linf.) Snyder & Hansen. Trans. Brit. Mycol. Soc., 40 : 145-154.

CARMICHAEL J.W. - 1962. *Chrysosporium* and some other aleuriosporic hyphomycetes. Canad. J. Bot., 40 : 1137-1173.

CARNS H.R., PRESLEY J.T., SCHNATHORST W.C., HARRISON G.K. et TAYLOR E.E. - 1964. Physiological and morphological responses of *Verticillium albo-atrum*. Proceed. twenty-fourth Meeting ; Cot. Dis. Council. Memphis, Ten. Jan.7-8.

CAUQUIL J. - 1963. Rapport de Mission en Iran. Campagne cotonnière 1963 (1342).
Ministère de l'Agriculture - Institut d'Amélioration des graines et des plantes. Département du Coton.
TEHERAN-IRAN. Publication IRCT -Paris- 52 pp.

CAUQUIL J. - 1964. Phytopathologie. Résultat des essais campagne 1964 - Iran.
Ministère de l'Agriculture. Institut d'Amélioration des graines et des plantes. Département du Coton. TEHERAN IRAN : 47 pp.

CAUQUIL J. et RAHMANI Y. - 1964. La Verticilliose du cotonnier en Iran. Distribution et incidence sur la production. Entomol. & Phytopath. Appl. (Iran), 22 : 7-15.

CAUQUIL J. et MILDNER P. - 1965. Première étude sur le comportement variétal du cotonnier en présence des pourritures de capsules. Cot. & Fibres Trop., 20 : 539-548.

CAUQUIL J. et MOCHIR ABADI M. - 1966. Les fontes de semis du cotonnier en Iran dans les provinces du Mazenderan et du Gorgan. Cot. & Fibres Trop., 21 : 411-418.

CELINO M.S. - 1936. Diseases of cotton in the Philippines. I- *Sclerotium* stem rot with notes on other diseases. Philipp. Agric., 25 : 302-320. (D'après Rev. Appl. Mycol., 16 : 95 (1937)).

CEZARD R. - 1961. L'excrétion radicellaire chez les végétaux supérieurs. Bull. Ec. Nat. Sup. Agron. Nancy, 3 : 114-166.

CHAIX P. et PETIT J.F. - 1956. Etude de différents spectres cytochromiques de *Bacillus subtilis*. Biochim. Biophys. Acta, 22 : 66-71.

CHEN C.T., CHEN S.S. et WANG J.Y. - 1964. Studies on the isolation and identification of seed an soil-borne *Verticillium* wilt organism of Cotton. Acta Phytopath. Sin., 7 : 135-142 (D'après Rev. Appl. Mycol., 44 : 2149 (1965)).

CHEO C.C. - 1944. *Verticillium* wilt of cotton (chinois). Chin. J. Sci. Agric., 1 : 258-263. (D'après Rev. Appl. Mycol., 25 : 341 (1946)).

CHESTER K.S. - 1938. Gravity grading, a method for reducing seed-borne disease in cotton. Phytopathology, 28: 745-749.

CHESTER K.S. - 1941. The probability law in cotton seedling disease. Phytopathology, 31 : 1078-1088.

CHRISTENSEN C.M., OLAFSON J.H. et GEDDES W.F. - 1949. Grain storages studies VIII Relation of molds in moist stored cotton seed to increased production of carbon dioxyde, fatty-acid, and heat. Cereal. Chem., 26 : 109-128.

CHRISTIE T. - 1966. Studies on the nitrogen metabolism of species of *Verticillium*. I- Amino acid nutrition of isolates of *Verticillium* pathogenic to tobacco and hops. N. Z. J. Agric. Res., 9 : 995-998.

CIOCAN C. et CALNEGRU I. - 1962. Trois *Fusarium* parasites de cotonnier en Roumanie. Rev. Mycologie Paris, 27 : 17-23.

COCHRANE V.W. - 1958. Physiology of fungi. John Willey & sons Inc. London, 524 pp. : p. 231.

COCHRANE V.W. - 1960. Spore Germination. Dans Plant Pathology: An advanced Treatise. HORSFALL J.C. et DIMOND A.E. (1960) vol. 2 : 715 pp. Academic Press, London. p. 167-202.

COCHRANE V.W. - 1966. Respiration and spore germination. Dans The FUNGUS SPORE - MADELIN M.F., Butterworths Ed. 1966. 338 pp. : p. 201-216.

COGNEE M. - 1960. Premières observations sur les fontes de semis de cotonniers à la station de Bambari. Phytiatrie Phytopharmacie, 9 : 207-222.

COGNEE M. - 1963. L'amélioration de la productivité en culture cotonnière par la désinfection fongicide et bactéricide des semences. Cot. & Fibres Trop., 18 : 249-264.

DARBY R.T. et GODDARD D.R. - 1950a. Studies of the respiration of the mycelium of the fungus *Myrothecium verrucaria* [illegible] Amer. J. Bot., 37 : 379-387.

DARBY R.T. et GODDARD D.R. - 1950b. The effects of cytochrome oxidase inhibitors on the cytochrome oxidase respiration of the fungus *Myrothecium verrucaria*. Physiol. Plantarum, 3 : 435-446.

DEESE D.C. et STAHMANN M.A. - 1960. Role of pectic enzymes in susceptibility and resistance to *Fusarium* and *Verticillium* wilts of plants. Phytopathology, 50 : 633 (Abstr.).

DIAZ POLANCO C. et DE ARMAS E. - 1964. Relaciones entre exudados de cuatro variedades de caraotas y el crecimiento de *Phytophthora parasitica*, *Pythium aphanidermatum* e *Isariopsis griseola*. Agronomia. Trop., 14 : 169-174.

DI FONZO M.A. - 1942. La humedad de la Semilla del Algodonero relacionada con su poder germinativo y con la presencia del *Aspergillus wentii*. Boll. Juncta nac. Algodon. B. Aires, 85-86 : 156-168.
(D'après Rev. Appl. Mycol., 22 : 64 (1943)).

DIMOND A.E. - 1955. Pathogenesis in the wilt diseases. Ann. Rev. Plant Physiol., 6 : 329-350.

DONGO D.S.L. - 1965. Especies de *Fusarium* aisladas en Algodonero. Boln. Estac. Exp. Agric. La Molina 8 - 15 pp.
(D'après Rev. Appl. Mycol., 45 : 3146 (1966)).

DRANSFIELD M. et CHANDRASRIVONGS C. - 1966. Plant Pathology. Prog. Rep. Exp. Stn. Emp. Cotton Grow Corp. (Thaïland) 1964-1965 : 14-16.

EBERHARDT F. - 1954. Ausscheidung einer organishen verbindung aus den Wurzeln des hafers (*Avena sativa* L.). Naturwissenschaften, 41 : 259.

EVANS G., VILHELM S. et SNYDER W.C. - 1966. Dissemination of *Verticillium* wilt fungus with cotton seed. Phytopathology, 56 : 460-461.

FARKAS G.L. et KIRALY Z. - 1958. Enzymological aspects of plant diseases. I. Oxidative enzymes. Phytopath. Z. 31 : 251-272.

FARKAS G.L. et KIRALY Z. - 1962. Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. Phytopath Z., 44 : 105-150.

FARKAS G.L., SOLYMOSY F. et LOVREKOVICH L. - 1965. The role of altered enzyme levels in the regulation of metabolic pattern in diseased plant tissues. Tagunsberichte D.A.L. (Berlin), 74 : 81.

FEDOTOVA I.I., GUSEVA N.N. et VLASOVA E.A. - 1963. O rannen porazhenii khlopchatnika viltom. Khlopkovodstvo, 13 :51. (D'après Rev. Appl. Mycol., 42 : 763 (1963)).

FULTON N.D., WADDLE B.A. et THOMAS R.O. - 1956. Influence of planting dates on Fungi isolated from diseased cotton seedlings. Pl. Dis. Reptr., 40 : 556-558.

GARBER R.H. et HOUSTON B.R. - 1959. An inhibitor of *Verticillium albo-atrum* in cotton seed. Phytopathology, 49 : 449-450.

GARBER R.H. et HOUSTON B.R. - 1966. Penetration and development of *Verticillium albo-atrum* in the cotton plant. Phytopathology, 56 : 1121-1126.

GARBER R.H. et HOUSTON B.R. - 1967. Nature of *Verticillium* wilt resistance in cotton. Phytopathology, 57 : 885-888.

GORLENKO M.V., LEVKINA L.M., USPENSKAYA G.D. et CHINNOV E.A. - 1962. Issledovaniya fiziologii i biokhimii nekotorykh parazitnykh gribov. Vestn. Moskov. Univ. Ser. biol., 3 : 49-55.
(D'après Rev. Appl. Mycol., 42 : 99 (1963)).

GREEN R.J. - 1960. The survival of *Verticillium albo-atrum* in muck soil. Phytopathology, 50 : 637 (Abstr.).

GRIFFITHS D.A. et ISAAC I. - 1966. Host parasite relationships between tomato and pathogenic isolates of *Verticillium*. Ann. Appl. Biol., 58 : 259-272.

GRIMM P.W. et ALLEN P.J. - 1954. Promotion by zinc of the formation of cytochromes in *Ustilago sphaerogena*. Plant Physiol., 29 : 369-377.

GUBANOV G. Ya. et BREDIKHINA A.I. - 1955. The study of the nature of cotton resistance to wilt. The results of work of the All-Union scientific research inst. of cotton breeding for 1954. Itogi Raboty Vses. Nauch Issled. In-ta Khlopkovodstva Za, 1954. Tashkent, SAGU, 2 : 57-63.

GUBANOV G. Ya. - 1962. O provrashchenii fenol nykh veshchestv u porazhennogo viltom khlopchanika. Fiziol. Rast., 9 : 614-619.
(D'après Rev. Appl. Mycol., 43 : 93 (1964)).

GUTKNECHT J. et MANIGHALAM A. - 1965. La production du coton en Iran. I- Généralités, égrenage. Cot. & Fibres Trop., 20 : 561-574.

HALISKY P.M., SCHNATHORST W.C. et SHAGRUN M.A. - 1961. Severity and distribution of cotton boll rots as related to temperature. Phytopathology, 51 : 501-505.

HALISKY P.M. et SATOUR M.M. - 1964. Evaluating fungicides for the control of *Rhizopus* boll-rot of cotton. Pl. Dis. Reptr., 48 : 359-363.

HALL L.T. et ELTING J.P. - 1951. Cavitomic cotton. A progress Report. Text. Res. J., 21 : 580-590.

HANSEN H.N. et SMITH R.E. - 1932. The mechanism of variation in imperfect fungi : *Botrytis cinerea*. Phytopathology, 22 : 953-964.

HANSFORD C.G. - 1929. Cotton diseases of Uganda, 1926 - 28. Emp. Cott. Grow. Rev., 6 : 160-167.

HANSFORD C.G. - 1937. Annoted host list of Uganda parasitic fungi and plant disease Part II. Part III. E. Afr. Agric. J., II - 6 : 498-504 ; III - 1 : 79-84.
(D'après Rev. Appl. Mycol., 16 : 838 (1937)).

HARBORNE J.B. - 1960. Plant Polyphenols 2-The coummarins of *Solanum pinnatisectum*. Biochem. J., 74 : 270-273.

HARE R.C. - 1966. Physiology of resistance to fungal diseases in plants. Botanical Rev., 32 : 95-137.

HARROLD T.J. - 1943. Histological studies of infections of the cotton hypocotyl by *Glomerella gossypii* and *Fusarium moniliforme*. Phytopathology, 33 : 666-673.

HEYN A.N.J. - 1958. The occurence of *Myrothecium* on field Cotton. Text. Res. J., 28 : 444-445.

HOUSTON B.R. et GARBER R.H. - 1959. Papers presented at the Cotton Disease Council at Houston, Texas, December 16, 1958. Pl. Dis. Reptr. Suppl., 259 pp. ; p. 233-235.

HUBBES M. et D'ASTOUS R. - 1967. Factors affecting the germination of spores of *Hypoxylon pruinatum*. Canad. J. Bot., 45 : 1145-1153.

HUDSON H.J. - 1963. The perfect state of *Nigrospora oryzae*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 46 : 356-360.

HUGHES J.C. et SWAIN T. - 1960. Scopolin production in potato tubers infected with *Phytophthora infestans*. Phytopathology, 50 : 398-400.

HUSSAIN S.S. et Mc KEEN W.E. - 1963. Interaction between strawberry roots and *Rhizoctonia fragariae*. Phytopathology, 53 : 541-545.

IN S.Y. - 1958. Study of the verticilliosis and fusariosis wilting. Mat. ob. nauch. Sess. Khlopk., Tashkent, 2 : 230-240 (Russe).
(D'après Rev. Appl. Mycol., 38 : 599 (1959)).

ISAAC I. - 1966. Vascular Disease pathogens with particular reference to the genus *Verticillium*. J. Indian Bot. Soc., 45 : 209-231.

ISAAC I. - 1967. Speciation in *Verticillium*. Ann. Rev. Phytopath., 4 : 201-222.

JOLY P. - 1964. Le genre *Alternaria*. Editions Paul Lechevalier, Paris, 250 pp.

KAMAL M. et WOOD R.K.S. - 1956. Pectic enzymes secreted by *Verticillium dahliae* and their role in the development of the wilt disease of cotton. Ann. Appl. Biol., 44 : 322-340.

KARPOVA-BENUA E.I. - 1954. Concerning toxic fungi on cotton fibre. (Russe). Bot. Zh. S.S.S.R., 39 : 488-497.
(D'après Rev. Appl. Mycol., 35 : 183 (1956)).

KOUBLANOVSKAJA G.M. et BRAILOVA V.V. - 1954. Rôle des substances antibiotiques de la sève du cotonnier dans son immunité à l'égard du wilt. (Russe). Microbiologia, 23:587-594.

KOVACHE A., LEVY R., GARNIER G. et MAGNOUX C. - 1954. Protection des matières plastiques et des textiles contre les microorganismes. Efficacité de quelques fongicides. Chim. & Industr., 71 : 1136-1139.

KUC J., HENZE R.E., ULLSTRUP A.J. et QUACKENBUSH F.W. - 1956. Chlorogenic and caffeic acids as fungistatic agents produced by potatoes in response to innoculation with *Helminthosporium carbonium*. J. Amer. Chem. Soc., 78 : 3123-3125.

KUC J. - 1964. Phenolic compounds and disease resistance in plants. Dans "Phenolics in Normal and diseased fruits and vegetables" Ed. V.C. Runeckles. Chap. 6 : 63-81.

LAGIERE R. - 1952. Possibilité de transmission de la fusariose du cotonnier (*F. vasinfectum* Atk.). Coton & Fibres Trop., 7 : 146-148.

LAGIERE R. et GUYOT J.L. - 1954. Classement des graines de cotonnier selon leur densité dans l'eau qualités et infection des 2 fractions. Coton & Fibres Trop., 9 : 128-138.

LANETSKII V.P. et GUSEVA N.N. - 1968. Viltoskop polevoi. Khlopkovodstvo, 18 : 32.
(D'après Rev. Appl. Mycol., 47 : 1136 (1968)).

LEAL J.A. et VILLANUEVA J.R. - 1962. Lack of pectic enzyme production by pathogenic species of *Verticillium*. Nature. London, 195 : 1328-1329.

LEDERER E. - 1959. Chromatographie en chimie organique et biologique. T. II, Masson & Cie. 671 pp.

LE GALL J. - 1961. Les problèmes phytosanitaires posés par la culture du cotonnier au Maroc. Al. Awania (Rev. Rech. Agron. Maroc), 1 : 75-105.

LEHMAN S.G. - 1939. Sixty-first annual report of the North-Carolina Agricultural Experiment Station for the fixal year ending June 30, 1938. Progress Report for year ending December 1, 1938, 83 pp.
(D'après Rev. Appl. Mycol., 18 : 787 (1939)).

LE TOURNEAU D., Mc LEAN J.G. et GUTHRIE J.W. - 1957. Effects of some phenols and quinones on growth in vitro of *Verticillium albo-atrum*. Phytopathology, 47 : 602-605.

LIBBERT E. et LÜBKE H. - 1960. Physiologische wirkungen des scopoletins. IV- Mitteilung scopoletin und adventivwurzelbildung. Flora, 149 : 77-94.

LITVINOV M.A. - 1964. The principal trends and methods of taxonomic studies on the causal agent of *Verticillium* wilt of plants (Russe). In : Transactions of the All-Union Symposium on cotton-wilt control - 240 pp. Tashkent Izdat. "Uzbekistan", p. 17-18.
(D'après Rev. Appl. Mycol., 45 : 806b (1966)).

LEWIS J.A. et PAPAVIZAS G.C. - 1967. Effects of tannins on spore germination and growth of *Fusarium solani f. phascoli* and *Verticillium albo-atrum*. Can. J. Microbiol., 13 : 1655-1661.

MACURA - 1966. Interactions nutritionnelles plantes-bactéries et bases expérimentales de la bactérisation des graines. Ann. Inst. Pasteur, Suppl. Sept. 1966 ; 111 : 9-38.

MAHADEVAN A., KUC J. et WILLIAMS E.B. - 1965. Biochemistry of resistance in cucumber against *Cladosporium cucumerinum*. I- Presence of a pectinase inhibitor in resistant plants. Phytopathology, 55 : 1000-1003.

MAIER C.R. - 1965. The importance of *Alternaria* spp. in the cotton seedling disease complexe in New Mexico. Pl. Dis. Reptr., 49 : 904-909.

MALCA I., ERWIN D.C., MOJE W. et JONES B. - 1966. Effect of pF carbon and nitrogen sources on the growth of *Verticillium albo-atrum*. Phytopathology, 56 : 401-406.

MALCA I., ERWIN D.C., SIMS J.J., LONG M. et JONES B. - 1968. Respiratory and Enzymatic Studies with *Verticillium albo-atrum* of cotton. Phytopathology, 58 : 348-353.

MANDELS C.R. - 1963. Endogenous respiration of fungus spores in relation to dormancy and germination. Ann. N.Y. Acad. Sci., 102 : 724-739.

MARCHIONATTO J.B. - 1939. Notas micologicas. Physio. B. Aires, 15 : 133-144.
(D'après Rev. Appl. Mycol., 25 : 578 (1946)).

MARSH P.B. et BOLLENBACHER K. - 1949. The fungi concerned in fibre deterioration : their occurence. Text. Res. J., 19 : 313-324.

MARSH P.B., BOLLENBACHER K., BUTLER M.L. et RAPER K.B. - 1949. The fungi concerned in fibre deterioration. II-Their ability to decompose cellulose. Text. Res. J., 19 : 462-484.

MARSH P.B., BUTLER M.L. et CLARK B.S. - 1949. Fungicidal activity of bisphenols. Indust. Engng. Chem., 41 : 2176-2184.
(D'après Rev. Appl. Mycol., 29 : 42 (1950)).

MARSH P.B. et KERR T. - 1961. Uncollapsed fibres associated with boll rot in cotton. Pl. Dis. Reptr., 45 : 550-551.

MARTIN C. - 1958. Etude de quelques déviations de métabolisme chez les plantes atteintes de maladies à virus. Thèse, Fac. Sci. Univ. Paris.

MARTIN P. - 1958. Einfluss der kulturfiltrate von mikroorganismen auf die abgabe von scopoletin aus des keimwurzeln des hafers (*Avena sativa L.*). Arch. Mikrobiol. Dtsch., 29 : 154-168.

MASON E.W. - 1933. Annoted account of fungi received at the Imperial Mycological Institute. List 2 - Fasc. 2. Kew 1933. 67 pp.

MASSENOT M. - 1964. A propos de la verticilliose du cotonnier. Coton & Fibres trop., 19 : 383-402.

MASSEY R.E. - 1934. Section of Botany and Plant Pathology CARS. Report by M. Massey on experimental work carried out by the staff of the section during season 1933-1934. Rep. Gezira Agric. Res. Serv. 1934. p. 119-141. (D'après Rev. Appl. Mycol., 14 : 756-757 (1935)).

MATHRE D.E., ERWIN D.C., PAULUS A.O. et RAVENSCROFT A.V. - 1966. Comparaison of the virulence of isolates of *Verticillium albo-atrum* from several of the cotton-growing regions in the United-States, Mexico and Peru. Pl. Dis. Reptr., 50 : 930-933.

MAUGRAS M. et URION E. - 1966. Analyse par chromatographie sur couche mince : Application aux aminoacides d'un milieu fermentaire. Biotechnique, 3 : 26-28.

MAYR H.H., DISKUS A. et BECK W. - 1963. Scopoletinanreicherung in den durch *Peronospora tabacina* Adam befallenen geweben von *Nicotiana tabacum* L. Phytopath. Z., 47 : 95-97.

Mc CORMACK R.B. - 1939. Seccao de Fitopatogia - ex O Instituto de Pesquizas. Agronomicos de Pernambuco. Rodriguesia, 4 - 30 - 34. (D'après Rev. Appl. Mycol., 19 : 135 (1940)).

MESSIAEN C.M. - 1959. La systématique du genre *Fusarium* selon Snyder et Hansen. Rev. Pathol. Vég. et d'Entom. Agric. de France, 38 : 253-266.

MESSIAEN C.M. et LAFON R. - . Maladies des plantes maraîchères. Vol. 2. Publications INRA, Paris ; 331 pp.

METLITSKII L.V. et FEDOTOVA T.I. - 1966. Izuchenie vzaimootnoshenii khlopchatnika i vozbuditelya vertitsilleznogo uvyadaniya vilt khlopchatnik. - Tashkent "Fan" p. 49-58. (d'après Rev. Appl. Mycol., 47 : 208 (1968)).

MILES L.E. - 1934. *Verticillium* Wilt of cotton in Greece. Phytopathology, 24 : 558-559.

MILLER P.R. - 1938. A survey of cotton seedling diseases and the fungi associated with them. Pl. Dis. Reptr., 22:260-263.

MILLER P.R. - 1939. A survey of cotton boll-rot diseases and the fungi associated with them. Pl. Dis. Reptr., 23: 29-32.

MILLER P.R. et WEINDLING R. - 1939. A survey of cotton boll rot diseases in 1939 and the microorganisms associated with them. Pl. Dis. Reptr., 23 : 329-334.

MILLER P.R. et WEINDLING R. - 1940. A survey of cotton seedling diseases in 1940 and the fungi associated with them. Pl. Dis. Reptr., 24 : 260-263.

MIRAKHMEDOV Z.S. - 1964. Study of the genetic nature of the resistance of cotton to *Verticillium* wilt (Russe). Tashkent Izdat Uzbekistan, p. 102-108. (D'après Rev. Appl. Mycol., 45 : 806 Z (1966)).

MIRPULATOVA N.S. - 1961. Some results from research on wilt. Khlopkovodstvo, 11 : 30-33 (Russe). (D'après Rev. Appl. Mycol., 40 : 755 (1961)).

MOORE R.T. et Mc ALEAR J.H. - 1962. Fine structure of Mycota. 7- Observations on septa of Ascomycetes and Basidiomycetes. Am. J. Bot., 49 : 86-94.

MORS W.B. et RIBEIRO R. - 1957. Occurence of scopoletin in the genus *Brunfelsia*. J. Org. Chem., 22 : 978.

MUSKETT A.E. et MALONE J.P. - 1941. The Ulster method for the examination of flax seed for the presence of seed-borne parasite. Ann. Appl. Biol., 28 : 8-13.

MUSSELL H.W. et GREEN Jr R.J. - 1968. Production of polygalacturonase by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* in vitro and in vascular tissue of susceptible and resistant hosts. Phytopathology, 58 : 1061 (Abs.).

MYERS B.D. et THRONEBERRY G.O. - 1966. Effect of gossypol on some oxidative respiratory enzymes. Pl. Physiol., 41 : 787-791.

NADAKAVUKAREN M.J. et HORNER C.E. - 1959. An alcohol agar medium selective for determining *Verticillium* microsclerotia in soil. Phytopathology, 49 : 527-528 (Abs.).

NAÏM M.S. et HUSSEIN A.M. - 1958. Growth response of *Fusarium oxysporum* to metabolites of some rhizospheric microflore of egyptian cotton varieties. Nature, 181 : 578.

x MILLER P.R. et WEINDLING R. - 1941. A survey of cotton seedling diseases in 1941 and the fungi associated with them. Pl. Dis. Reptr., 25 : 378-380.

NAÏM M.S. - 1965. Transpiration rates of wilt resistant and susceptible cotton variety seedlings in response to *Fusarium equiseti* metabolites. Phytopath. Z., 54 : 157-161.

NASYROV O. - 1962. Diseased of cultivated and some wild plants in the districts of the middle reaches of Amu-Darya. Izv. Akad. Nauk. S.S.R. Biol. Sci., 6 : 46-53. (D'après Rev. Appl. Mycol., 42 : 372 (1963)).

NAZIROV N.N. et ZAPRUDER E.G. - 1960. The physical and chemical characters of the biocolloïds and the resistance of cotton to wilt (Russe). Dokl. Akad. Nauk. Uzb. S.S.R., 6: 44. (D'après Rev. Appl. Mycol., 40 : 682 (1961)).

NAZIROV N.N., ZAPRUDER E.G., DZHANIKULOV F., MAVLYANKHODZHAEVA S. et KHAKIMOVA M. - 1961. K biokhimii viltoustoichivosti khlopchatnika. Uzb. Biol. Zh., 5 : 45-46. (D'après Rev. Appl. Mycol., 41 : 520 (1962)).

NEERGARD P. - 1945. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Einar Munksgaard, Publisher Copenhagen. 560 pp.

NOPITSCH M. , MÖBUS E. et HAVENITH D. - 1958. Die Gelbflecken-krankheit der baumvolle. Melliand Textilber, 39 : 1268-1271. (D'après Rev. Appl. Mycol., 38 : 477 (1959)).

NOUR-EL-DEIN M.S. et SHARKAS M.S. - 1964. The pathogenecity of *Rhizoctonia solani* in relation to different tomato root exsudates. Phytopath. Z., 51 : 285-290.

OHANIANCE L. - 1967. Etude de la synthèse, induite par l'oxygène du système respiratoire chez la levure : Influence de Zn^{++}. Thèse Sciences, Paris. CNRS AO 1454, p. 85.

O'LEARY J.W. - 1966. Temperature effects on root pressure exudation. Ann. Bot., 30 : 419-423.

OZERECKOVSKAJA O.L. et GUSEVA N.N. - 1966. Rôle des composés phénoliques dans la résistance du cotonnier à la verticilliose (Russe). Trudy vsesojuz nauch isledova Inst. Zashch. Rasten U.S.S.R., 26 : 132-135.

PANTON C.A. - 1964. A review of some aspects of the wilt pathogen *Verticillium albo-atrum*, Rke. & Berth. Acta Agric. Scandinavica, 14 : 97-112.

PARK D. - 1963. The ecology of soil-borne fungal disease. Ann. Rev. Phytopath., 1 : 241-258.

NAÏM M.S. - 1965. Transpiration rates of wilt resistant and susceptible cotton variety seedlings in response to *Fusarium equiseti* metabolites. Phytopath. Z., 54 : 157-161.

NASYROV O. - 1962. Diseased of cultivated and some wild plants in the districts of the middle reaches of Amu-Darya. Izv. Akad. Nauk. S.S.R. Biol. Sci., 6 : 46-53. (D'après Rev. Appl. Mycol., 42 : 372 (1963)).

NAZIROV N.N. et ZAPRUDER E.G. - 1960. The physical and chemical characters of the biocolloïds and the resistance of cotton to wilt (Russe). Dokl. Akad. Nauk. Uzb. S.S.R., 6: 44. (D'après Rev. Appl. Mycol., 40 : 682 (1961)).

NAZIROV N.N., ZAPRUDER E.G., DZHANIKULOV F., MAVLYANKHODZHAEVA S. et KHAKIMOVA M. - 1961. K biokhimii viltoustoichivosti khlopchatnika. Uzb. Biol. Zh., 5 : 45-46. (D'après Rev. Appl. Mycol., 41 : 520 (1962)).

NEERGARD P. - 1945. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Einar Munksgaard, Publisher Copenhagen. 560 pp.

NOPITSCH M. , MÖBUS E. et HAVENITH D. - 1958. Die Gelbfleckenkrankheit der baumvolle. Melliand Textilber, 39 : 1268-1271. (D'après Rev. Appl. Mycol., 38 : 477 (1959)).

NOUR-EL-DEIN M.S. et SHARKAS M.S. - 1964. The pathogenecity of *Rhizoctonia solani* in relation to different tomato root exsudates. Phytopath. Z., 51 : 285-290.

OHANIANCE L. - 1967. Etude de la synthèse, induite par l'oxygène du système respiratoire chez la levure : Influence de Zn^{++}. Thèse Sciences, Paris. CNRS AO 1454, p. 85.

O'LEARY J.W. - 1966. Temperature effects on root pressure exudation. Ann. Bot., 30 : 419-423.

OZERECKOVSKAJA O.L. et GUSEVA N.N. - 1966. Rôle des composés phénoliques dans la résistance du cotonnier à la verticilliose (Russe). Trudy vsesojuz nauch isledova Inst. Zashch. Rasten U.S.S.R., 26 : 132-135.

PANTON C.A. - 1964. A review of some aspects of the wilt pathogen *Verticillium albo-atrum*, Rke. & Berth. Acta Agric. Scandinavica, 14 : 97-112.

PARK D. - 1963. The ecology of soil-borne fungal disease. Ann. Rev. Phytopath., 1 : 241-258.

PATIL S.S., POWELSON R.L. et YOUNG R.A. - 1964. Relation of chlorogenic acid and free phenols in potato roots to infection by *Verticillium albo-atrum*. Phytopathology, 54 : 531-535.

PATIL S.S. et DIMOND A.E. - 1967. Inhibition of *Verticillium* polygalacturonase by oxydation products of polyphenols. Phytopathology, 57 : 492-496.

PATIL S.S. et DIMOND A.E. - 1968. Effect of phenols and cytokinins on polygalacturonase production by *Verticillium albo-atrum*. Phytopathology, 58 : 868-869.

PEEPLES J.L. Jr et BAIN D.C. - 1966. Infection of cotton seed by *Rhizoctonia*. Pl. Dis. Reptr., 50 : 770-772.

PERRY D.A. - 1961. *Fusarium* wilt of cotton. Prog. Rep. Exp. Stn. Emp. Cot. Gr. Corp., (Tanganyika) 1959-1960. pp.10-12. (D'après Rev. Appl. Mycol., 40 : 754 (1961)).

PINCKARD J.A. - 1964. Report of the boll rot committee. Cott. Dis. Counc. Proc. 24th Meeting. Memphis, Tennessee, 7-8 janvier 1964. p. 19.

POPOVA T.E. - 1964. Aminokisloty i immunitet k viltu (Russe). Khlopkovodstvo, 14 : 45-46.

POWELSON R.L. - 1966. Availability of diffusible nutrients for germination and growth of *Verticillium dahliae* in soils amended with oat and alfalfa residues. Phytopathology, 56 : 895 (Abs.).

PRASAD N. - 1944. Studies of the root rot of cotton in Sind. Indian J. Agric. Sci., 14 : 40-43.

PRESLEY J.T. - 1950. *Verticillium* wilt of cotton with particular emphasis on variation of the causal organism. Phytopathology, 40 : 497-511.

RADA G.G. - 1935. Principales enfermedades del algondonero en el Peru. Circ. Estac. Exp. Agric. Lima, 28 : 19. (D'après rev. Appl. Mycol., 15 : 18 (1936)).

RAPER K.B. et FENNELL D.I. - 1965. The genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Cie Editeur, 688 pp.

RAY W.W. et Mc LAUGHLIN J.H. - 1942. Isolation and infection tests with seed and soil-borne cotton pathogens. Phytopathology, 32 : 233-238.

REEB F. - 1963. La culture de coton en Iran. Bull. Ec. Nat. Sup. Agr. Nancy, 5 : 199-218.

REID W.W. - 1958. Chem & Ind. (London) 1439.
Dans GEISSMAN T.A. The Chemistry of flavonoïds compounds. Pergamon Press, 1962. 666 pp. ; p. 392.

ROGER L. - 1953. Phytopathologie des pays chauds. 3 vol. Editions Paul Lechevalier. Paris. p. 1982.

ROHRINGER R. et SAMBORSKI D.J. - 1967. Aromatic compounds in the host parasite interaction. Ann. Rev. Phytopath., 5 : 77-86.

ROUX J.B. - 1962. Rapport au Gouvernement de l'Iran sur l'Amélioration de la production cotonnière. Rapport n° 1567. FAO - Rome, 29 pp.

ROVIRA A.D. - 1959. Root excretions in relation to the rhizosphère effect. IV- Influence of plant species, age of plant, light, temperature and calcium nutrition on exsudation. Pl. & Soil, 11 : 53-64.

ROVIRA A.D. - 1965. Plant root exsudates and their influence upon soil microorganisms. Dans Ecology of soil-borne pathogens. Prelude to biological control. K. F. BAKER & W.C. SNYDER. University of California Press, 571 pp. ; p. 170-186.

ROVIRA A.D. - 1965. Interactions between plant roots and soil microorganisms. Ann. Rev. Microbiol., 19 : 241-266.

RUBIN B.A. et PEREVYAZKINA L.M. - 1951. The role of tannic substances in the phenomena of resistance of the cotton plant to wilt (Russe). C.R. Acad. Sci. U.R.S.S. N.S., 79 : 303-306.
(D'après Rev. Appl. Mycol., 32 : 312 (1953)).

RUBIN B.A. et ARTSIKHOVSKAYA Ye. V. - 1963. Biochemistry and Physiology of Plant Immunity. Pergamon Press. London. 358 pp.

RUBIN B.A. et ARTSIKHOVSKAYA Ye. V. - 1964. Biochemistry of Pathological darkening of Plant tissues. Ann. Rev. Phytopath., 2 : 157-178.

RUBIN B.A. et ARCICHOVSKAJA E.V. - 1967. The biochemical and physiological background of plant immunity. Phytopath. Z., 58 : 101-121.

RUDOLPH B.A. et HARRISON G.J. - 1944. The unimportance of cotton seed in the dissemination of *Verticillium* wilt in California. Phytopathology, 34 : 849-860.

RUDOLPH B.A. et HARRISON G.J. - 1945. The invasion of the internal structure of cotton seed by certain *Fusaria*. Phytopathology, 35 : 542-548.

SADASIVAN T.S. - 1965. Physiology of wilting plants. Tagunsberichte D.A.L. Berlin, 74 : 149-163.

SARGENT J.A. et SKOOG F. - 1961. Scopoletin glycosides in tobacco plants. Physiol. Plant., 14 : 504-519.

SCHNATHORST W.C. et HALISKY P.M. - 1960. Severity-Prevalence and ecology of cotton boll-rots as related to temperature. Phytopathology, 50 : 653-654 (Abs.).

SCHNATHORST W.C. - 1962. The microbial inhibitor in cotton seed an artifact. Phytopathology, 52 : 279-285.

SCHNATHORST W.C., PRESLEY J.T. et CARNS H.R. - 1964. Properties of tracheal fluids from susceptible and resistant cottons and their relation to development of *Verticillium albo-atrum*. Phytopathology, 54 : 906 (Abs.)

SCHNATHORST W.C., PRESLEY J.T., CARNS H.R. et COPLIN D. - 1965. Conidial germination in *Verticillium albo-atrum* as related to various organic substrates, chemical properties of tracheal fluids from susceptible and resistant cottons and age. Proceed. Twenty-fifth meeting. Cotton Disease Council. Atlanta. Georgia - January 11-13, 1965 ... ; p. 120-123.

SCHNATHORST W.C. et MATHRE D.E. - 1966. Host range and differentiation of a severe form of *Verticillium albo-atrum* in cotton. Phytopathology, 56 : 1155-1161.

SCHNATHORST W.C. et MATHRE D.E. - 1966. Cross-protection in cotton with strains of *Verticillium albo-atrum*. Phytopathology, 56 : 1204-1209.

SCHRAMM G. et BENEDICT J.H. - 1958. Quantitative determination of traces of free gossypol in fats, oils and fatty acids by paper chromatography. J. Am. Oil Chemist's Soc., 35 : 371-373.

SCHREIBER L.R. et GREEN R.J. Jr - 1962. Comparative survival of mycelium, conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in mineral soil. Phytopathology, 52:288-289.

SCHREIBER L.R. - 1962. The soil survival and germination of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* R.& B. Diss. Abstr., 22 : 2160.

SCHREIBER L.R. et GREEN R.J. Jr - 1963. Effect of root exsudates on germination of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* inhibited by the soil fungistatic principle. Phytopathology, 53 : 260-264.

SCHROTH M.N. et HILDEBRAND D.C. - 1964. Influence of plant exsudates on root-infecting fungi. Ann. Rev. Phytopath., 2 : 101-133.

SCHROTH M.N., WEINHOLD A.R. et HAYMAN D.S. - 1966. The effect of temperature on quantitative differences in exudates from germinating seeds of bean, pea and cotton. Can. J. Bot., 44 : 1429-1432.

SEWELL G.W.F. - 1959. Direct observation of *Verticillium albo-atrum* in soil. Trans. Brit. Mycol. Soc., 42 : 312-321.

SHERMAN F. - 1965. The genetic control of the cytochrome system in yeast. Colloque International sur les mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les microorganismes. Marseille 1963. Ed. CNRS. Paris 1965. p. 465.

SIMMONS E.G. - 1967. Typification of *Alternaria, Stemphylium* and *Ulocladium*. Mycologia, 59 : 67-92.

SIMPSON M.E. et MARSH P.B. - 1965. Effects produced in cotton fibre by boll rotting species of *Rhizopus*. Phytopathology, 55 : 52-56.

SKOOG F. et MONTALDI E. - 1961. Auxin-kinetin interaction regulating the scopoletin and scopolin levels in tobacco cultures. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 47 : 36-49.

SMITH F.H. - 1960. Preparation of pure gossypol from dianilinogossypol. J. Am. Oil Chemist's Soc., 37 : 286-288.

SNYDER W.C. et HANSEN H.N. - 1940. The species concept in *Fusarium*. Am. J. Bot., 27 : 64-67.

SNYDER W.C. et HANSEN H.N. - 1941. The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. Am. J. Bot., 28 : 738-742.

SNYDER W.C. et HANSEN H.N. - 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. Am. J. Bot., 32 : 657-666.

SNYDER W.C. et TOUSSOUN T.A. - 1965. Current status of taxonomy in *Fusarium* species and their perfect stages. Phytopathology, 55 : 833-837.

SOLOVEVA A.I. et POLYARKOVA L.V. - 1940. Wilt of cotton. Tashkent Agricultural Publishing Dept. Uzbekistan Soviet Republic. 63pp. (Russe).
(D'après Rev. Appl. Mycol., 27 : 19 (1948)).

SOMERS T.C. et HARRISON A.F. - 1967. Wood tannins isolation and significance in host resistance to *Verticillium* wilt disease. Austral. J. Biol. Sci., 20 : 475-479.

SOUKHATCHEVA N.V. - 1960. Rôle des antibiotiques dans l'immunité du cotonnier vis-à-vis du wilt. (Russe).
Tashkent nauch. issled. Inst. Zh. Rast. nauch Issled po Zashch. Rast., p. 206-215.
(D'après Bull. Sign. Cot. & Fibres trop., 18 : 47 (1963)).

STAHMAN M.A. - 1965. The biochemistry of proteins of the host and parasite in some plant diseases. Tagunsberichte D.A.L. Berlin, 74 : 9-40.

SUBBA-RAO N.S. et BAILEY D.L. - 1961. Rhizosphère studies in relation to varietal resistance or susceptibility of tomato to *Verticillium* wilt. Canad. J. Bot., 39 : 1747-1758.

SULOCHANA C.B. - 1958. Root exudates. Mem. Ind. Pot. Soc., 1 : 94-97.

SULOCHANA C.B. - 1962. Cotton roots and vitamin requiring and amino-acid requiring bacteria. Pl. & Soil., 16:335-346. x

SUSSMAN A.S. - 1966. Dormancy and spore germination. Dans The Fungi an advanced treatise. G.C. Ainsworth et A.S. Sussmann. Academic Press. London. Vol. 2, 805 pp. ; p. 733-764.

TAUBENHAUS J.J. et EZEKIEL W.N. - 1932. Seed transmission of cotton wilt. Science, 76 : 61-62.

TAUBENHAUS J.J. - 1936. *Verticillium* wilt of cotton. Texas Agr. Exp. Sta. 49th Ann. Rept. : p. 111.

TAUBENHAUS J.J. - 1937. *Verticillium* a seed-borne disease. Proceed. Second Ann. Meet. Cotton Dis. Council. Nashville, Tenn. 8pp.

THRONEBERRY G.O. et BECHTOL M.K. - 1965. Some aspects of respiratory metabolism of *Verticillium albo-atrum*. Proceed of 25th Meet. Cot. Dis. Council. Atlanta, Georgia, Jan. 12-13. p. 118-119.

---

x SULOCHANA C.B. - 1962. Amino acids in root exsudates of cotton Pl. & Soil, 16 : 312-326.

THRONNEBERRY G.O. - 1967. Relative activities and characteristics of some oxidative respiratory enzymes from conidia of *Verticillium albo-atrum*. Pl. Physiol., 42 : 1472-1478.

TIMONIN M.I. - 1940. The interaction of higher plants and soil microorganisms. II- Study of the microbial population of the rhizosphère in relation to resistance of plants to soil-borne diseases. Can. J. Res., 18 : 444-455.

TOMIYAMA H. - 1963. Physiology and biochemistry of disease resistance of plants. Ann. Rev. Phytopath., 1 : 295-324.

UMBREIT W.W., BURRIS R.H. et STAUFFER J.F. - 1959. Manometric techniques. Burgess Publishing Co. 338 pp.

URITANI I.T. et MURAMATSU K. - 1953. Pathological chemistry of black rotted sweet potato. 4- Isolation and identification of polyphenols from injured sweet potato. J. Agric. Chem. Soc. Japan, 27 : 27.

URITANI I. - 1953. Phytopathological chemistry of blackrotten sweet potato. J. Agric. Soc. Japan, 27 : 24, 57, 161, 165.

URITANI I. - 1965. Molecular pathology in the plant field with special regard to defense action of the host. Tagunsberichte D.A.L. Berlin, 74 : 201-218.

VAN ANDEL O.M. - 1966. Amino-acids and plant diseases. Ann. Rev. Phytopath., 4 : 349-368.

VANCURA V. - 1967. Root exudates of Plants III- Effect of temperature and "Cold Shock" on the exudation of various compounds from seeds and seedlings of maize and cucumber. Pl. & Soil, 27 : 319-328.

VAN ETTEN J.L., MOLITORIS H.P. et GOTTLIEB D. - 1966. Changes in fungi with age. II-Respiration and respiratory enzymes of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium bataticola*. J. Bacteriol., 91 : 169-175.

VENKATRAM C.S. - 1950. Seed-borne fungi and loss of cotton seed viability. J. Mad. Univ., 19 : 79-112.

VENKATRAM C.S. - 1951. Seed-borne fungi and loss of seedling vigour in cotton. J. Madras Univ., 21-B : 288-303.

VERONA O. - 1958. "La Spermosphère". Ann. Inst. Pasteur, 95 : 795-798.

VERONA O. - 1966. The "Seed-effect". Rev. Roumaine Biol., 11 : 255-256.

VIEGAS A.P. - 1961. Murchas do Algodoeiro. Bragantia, 20 : 547-556.
(D'après Bull. Sign. Cot. & Fibres Trop., 17 : 59 (1962)).

VOORHEES R.K. - 1933. *Gibberella moniliformis* on corn. Phytopathology, 23 : 368.

WALKER J.C. et STAHMANN M.A. - 1955. Chemical nature of disease resistance in plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 6 : 351-366.

WALKER J.C. - 1962. The physiology of disease resistance. Dans : Physiology of fungi and fungus diseases. Papers presented on the occasion of the 50th anniversary of the establishment of the Department of Plant Pathology at West Virginia University (1962) 25 pp.

WHITE W.L., DARBY R.T., STECHERT G.M. et SANDERSON K. - 1948. Analysis of cellulolytic activity of molds isolated from fabrics and related items exposed in the tropics. Mycologia, 40 : 34-84.

WICKENS G.M. - 1948. Progress Reports from Experiment Stations season 1946-1947. London Empire Cotton growing Corporation 152 pp..
(D'après Rev. Appl. Mycol., 27 : 473 (1948)).

WICKENS G.M. - 1963. *Fusarium* wilt. Prog. Rep. Exp. Stat. Cott. Grow. Corp. (Tanganyika) 1961 ; 62 : 24-26.

WICKENS G.M. - 1964. *Fusarium* wilt of cotton-seed husk a potential means of dissemination. Emp. Cott. Grow. Rev., 41 : 23-26.

WIESE M.V., DEVAY J.E. et RAVENSCROFT A. - 1968. Virulence of *Verticillium albo-atrum* in cotton in relation to colony characteristics and endopolygalacturonase production. Phytopathology, 58 : 1072 (Abst.).

WILES A.B. - 1952. A seedling innoculation technique for testing cotton varieties for resistance to *Verticillium* wilt. Phytopathology, 42 : 288 (Abst.).

WILES A.B. - 1963. Relation of seed-borne fungi to boll-rots of cotton. Phytopathology, 53 : 984.

WILHELM S. - 1951. Is *Verticillium albo-atrum* a soil invader or a soil inhabitant ? Phytopathology, 41 : 944-945.

WOLLENWEBER H.W. et REINKING O.A. - 1935. Die *Fusarien*. Ed. Paul Parey. Berlin. 355 pp.

WOODROOF N.C. - 1927. A disease of cotton roots produced by *Fusarium moniliforme* Sheld. Phytopathology, 17 : 227-238.

YANKOVSKAYA E.N. - 1966. K voprosu proyavleniya vilta na rannykh stadiyakh razvitiya Khlopchatnika. Byull. nauchno-tekh. Inf. Tadzh. n.i Inst. S. Kh., 4 : 74-77. (D'après Rev. Appl. Mycol., 47 : 529 (1968)).

YARWOOD C.E. - 1967. Response to parasites. Ann. Rev. Pl. Physiol., 18 : 419-438.

YUEN C. et TAN C. - 1958. A method for the inspection and isolation of seed-borne *Verticillium* from cotton seeds (Chinois). Acta Phytopath. Sin., 4 : 121-127. (D'après Rev. Appl. Mycol., 39 : 106 (1960)).

ZACHARIAH T., HANSEN H.N. et SNYDER W.C. - 1956. The influence of environmental factors on cultural characters of *Fusarium* species. Mycologia, 68 : 459-467.

Anonyme - 1937. Pl. Pathology. Rep. Ariz. Agric. Exp. Stat. (1936-1937) 77-91. (D'après Rev. Appl. Mycol., 17 : 504 (1938)).

—— - 1947. Cotton Boll rots in Oklahoma (1946). Bull. Okla. Agric. Exp. Stat. B.300 ; 26 pp. (D'après Rev. Appl. Mycol., 26 : 152 (1947)).

—— - 1947. Progress Report from Experiment Stations season 1945-1946. London Empire Cotton Growing Corporation ; 132 pp. (D'après Rev. Appl. Mycol., 26 : 451 (1947)).

—— - 1952. Rapport annuel pour l'exercice 1951. Publ. Inst. Nat. Agron. Congo Belge (Hors sér.) ; 436 pp. (D'après Rev. Appl. Mycol., 33 : 143 (1954)).

—— - 1952. Activité de l'I.R.C.T. - Année 1951. Cot. & Fibres Trop., 7 : 5-126.

T A B L E D E S M A T I E R E S

INTRODUCTION 1

I - PREMIERE PARTIE : CONDITIONS EXPERIMENTALES ET TECHNIQUES..... 5

I-1 ANALYSE DE LA MYCOFLORE DES SEMENCES DE COTONNIER.. 5

I-1-1 Analyse de la mycoflore externe des quelques échantillons de semences de cotonnier de provenance iranienne..... 5

I-1-1-1 Origine du matériel utilisé..... 5

I-1-1-2 Recherche des mycrocétes par la culture sur milieux artificiels..... 6

I-1-1-2-1 Milieux utilisés..... 6

I-1-1-2-2 Notations..... 7

I-1-1-2-2-1 Méthodes utilisées..... 7

I-1-1-2-2-2 Résultats exprimés..... 8

I-1-1-2-2-2-1 Pourcentage de germination..... 8

I-1-1-2-2-2-2 Pourcentage d'humidité des semences..... 8

I-1-1-2-2-2-3 Fréquence spécifique..... 8

I-1-1-2-2-2-4 Indice de pollution..... 9

I-1-1-3 Recherche des spores et sclérotes..... 9

I-1-1-3-1 Méthode de dilution..... 9

I-1-1-3-2.Observations microscopiques..... 10

I-1-2 Analyse de la mycoflore interne des semences de cotonnier..... 10

I-1-2-1 Origine du matériel utilisé..... 10

I-1-2-1-1 Semences d'origine iranienne..... 10

I-1-2-1-2 Semences d'origines diverses..... 11

I-1-2-2 Délintage et stérilisation superficielle des semences..... 11

I-1-2-3 Recherche de la mycoflore interne totale par culture sur milieux artificiels..... 12

I-1-2-3-1 Milieux utilisés..... 12

I-1-2-3-2 Critères de notation..... 13

I-1-2-4 Recherche des parasites dans les téguments ou les amandes des semences..... 13

I-1-3 Conservation et détermination des souches..... 13

I-1-3-1 Genre Fusarium..... 13

I-1-3-2 Genres Alternaria et Stemphylium..... 15

I-1-3-3 Genre Aspergillus..... 15

I-1-3-4 Autres genres..... 15

I-2 CULTURE ASEPTIQUE DES COTONNIERS ET OBTENTION DES EXSUDATS RADICELLAIRES..... 16

I-2-1 Origine du matériel utilisé..... 16

I-2-2 Cultures..... 17

I-2-2-1 Traitement préalable du sable..... 17

I-2-2-2 Préparation des milieux..... 17

I-2-2-2-1 Culture dans les bocaux..... 17

I-2-2-2-2 Culture dans les appareils de culture..... 18

I-2-2-3 Délintage et stérilisation superficielle des semences..... 18

I-2-2-4 Contrôle de la stérilité et de la germination des semences..... 18

I-2-2-5 Elimination des téguments..... 18

I-2-2-6 Plantation..... 19

I-2-3 Conditions de culture..... 19

I-2-3-1 Lumière..... 19

I-2-3-2 Température..... 20

I-2-3-3 Durée de la culture..... 20

I-2-3-4 Contrôle de la stérilité..... 20

I-2-4 Obtention des exsudats..... 21

I-2-3 Stérilisation..... 22

I-2-6 Conservation..... 22

I-3 ACTION DES EXSUDATS RADICELLAIRES DE COTONNIERS, SENSIBLES, TOLERANTS ET RESISTANTS SUR LA VITESSE DE RESPIRATION DU MYCELIUM ET DES CONIDIES DU Verticillium dahliae Kleb..... 23

I-3-1 Préparation d'une suspension de mycélium ou de conidies..... 23

I-3-1-1 Souche utilisée..... 23

I-3-1-2 Milieu de culture..... 23

I-3-1-3 Culture..... 24

I-3-1-4 Courbe de croissance..... 24

I-3-1-5 Obtention de la suspension de mycélium ou de conidies..... 24

I-3-2 Mesure de la vitesse de respiration du mycélium et des conidies en présence des exsudats..... 25

I-3-2-1 Préincubation du mycélium ou des conidies en présence des exsudats..... 25

I-3-2-2 Technique manométrique..... 26

I-4 SPECTRE HEMATINIQUE (-190°C) DU Verticillium dahliae..... 27

I-5 CROISSANCE LINEAIRE DU MYCELIUM DE V. dahliae SUR MILIEU GELOSE EN PRESENCE DES EXSUDATS..... 28

I-5-1 Préparation du milieu..... 28

I-5-2 Préparation de l'innoculum..... 28

I-6 GERMINATION DES CONIDIES DU V. dahliae EN PRESENCE DES EXSUDATS RADICELLAIRES..... 29

I-6-1 Obtention d'une suspension de conidies..... 29

I-6-2 Technique utilisée..... 29

I-7 QUELQUES ANALYSES DES EXSUDATS RADICELLAIRES DE COTONNIERS..... 31

I-7-1 Origine du matériel et obtention des exsudats.... 31

I-7-2 Analyse des acides aminés..... 31

I-7-2-1 Chromatographie échangeuse d'ions..... 31

I-7-2-1-1 Activation de la résine et confection de la confection de la colonne..... 31

I-7-2-1-2 Chromatographie..... 31

I-7-2-2 Chromatographie sur couche mince..... 32

I-7-2-2-1 Confection de chromatoplaques..... 32

I-7-2-2-2 Lavage des chromatoplaques..... 32

I-7-2-2-3 Dépôt du mélange d'acides aminés à analyser.. 33

I-7-2-2-4 Première dimension..... 33

I-7-2-2-5 Deuxième dimension..... 33

I-7-2-2-6 Révélation..... 33

I-7-3 Analyse des composés phénoliques..... 34

I-7-3-1 Chromatographie des composés phénoliques..... 34

I-7-3-1-1 Extraction préliminaire des matières grasses 34

I-7-3-1-2 Extraction des composés phénoliques..... 34

I-7-3-1-3 Déposes..... 35

I-7-3-1-4 Solvants et temps de migration..... 35

I-7-3-1-5 Révélations..... 35

I-7-3-2 Recherche du gossypol dans les exsudats..... 36

I-7-3-2-1 Préparation et extraction du gossypol à partir des semences..... 36

I-7-3-2-1-1 Extraction du gossypol et précipitation du dianilinogossypol..... 36

I-7-3-2-1-2 Hydrolyse de dianilinogossypol et cristallisation du gossypol - acide - acétique... 36

I-7-3-2-1-3 Extraction du gossypol à partir de gossypol acide acétique..... 37

I-7-3-2-2 Essais d'extraction et de chromatographie du gossypol à partir des exsudats..... 37

I-7-3-2-2-1 Extraction au gossypol..... 37

I-7-3-2-2-2 Chromatographie..... 38

II - DEUXIEME PARTIE : ANALYSE DE LA MYCOFLORE DES SEMENCES DE COTONNIERS..... 39

II-1 INFLUENCE DU MILIEU..... 54

II-1-1 Sur la mycoflore externe..... 54

II-1-1-1 Milieux riches en éléments nutritifs..... 54

II-1-1-2 Milieux relativement pauvres en éléments nutritifs..... 54

II-1-2 Sur la mycoflore interne..... 55

II-2 TENEUR EN HUMIDITE..... 56

II-3 POURCENTAGE DE GERMINATION..... 56

II-4 INDICE DE POLLUTION..... 57

II-5 GENRES ET ESPECES ISOLES..... 57

II-5-1 Le genre Fusarium..... 58

II-5-1-1 Fusarium moniliforme (Scheld) Sn. et Hansen.. 58

II-5-1-2 Fusarium oxysporum (Scheld) Sn. et Hansen.... 60

II-5-1-2-1 Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum (Atk) Sn. et Hansen..... 61

II-5-1-3 Fusarium solani (Mart.) (App. et We.) Sn. et H.62

II-5-1-4 Fusarium roseum (LK.) Sn. et H..... 62

II-5-2 Le genre Alternaria..... 62

II-5-2-1 Alternaria tenuissima (Fries) Wiltshire..... 62

II-5-2-2 Alternaria tenuis (Nees)..... 64

II-5-2-3 Alternaria dendritica (de S. da Cam.) Joly... 65

II-5-3 Le genre Aspergillus..... 65

II-5-4 Autres genres..... 66

II-5-4-1 Rhizoctonia solani Kühn..... 66

II-5-4-2 Nigrospora oryzae (B. et Br.)Petch..... 67

II-5-4-3 Rhyzopus nigricans Ehrenb..... 68

II-5-4-4 Trichothetium roseum Link ex Fr..... 68

II-6 RECHERCHES PARTICULIERES POUR LA MISE EN EVIDENCE DE Verticillium dahliae SUR LES SEMENCES..... 69

II-7 CONCLUSION..... 71

III - TROISIEME PARTIE

III-1 INFLUENCE DES EXSUDATS RADICELLAIRES DES PLANTULES DE COTONNIERS SENSIBLE, TOLERANTS OU RESISTANT SUR CERTAINS ASPECTS DU METABOLISME DE Verticillium dahliae Kleb. 75

III-1-1 Action des exsudats radicellaires des cotonniers sur la respiration du mycélium de V. dahliae 79

III-1-2 Actions des exsudats radicellaires des plantules de cotonniers sur la respiration des conidies de V. dahliae 82

III-1-3 Spectre hématinique de V. dahliae 83

III-1-4 Mesure de la vitesse de respiration du mycélium de V. dahliae, en présence d'air, de glucose et de quelques inhibiteurs 85

III-1-4-1 Cyanure de potassium 85

III-1-4-2 2,4-dinitrophénol 87

III-1-4-3 Dicoumarol-gossypol-scopolétine 89

III-1-4-3-1 Dicoumarol 89

III-1-4-3-2 Gossypol 89

III-1-4-3-3 Scopolétine 90

III-1-5 Action des extraits à l'acétate d'éthyle des exsudats radicellaires de cotonniers sur la respiration du mycélium de V. dahliae incubé en leur présence 93

III-1-6 Influence des exsudats radicellaires de différentes variétés de cotonniers sur la germination des conidies et la croissance linéaire de V. dahliae... 93

III-1-6-1 Germination des conidies 94

III-1-6-2 Croissance linéaire 94

III-2 ANALYSES DES EXSUDATS RADICELLAIRES DE PLANTULES DE COTONNIERS SENSIBLE, TOLERANTS OU RESISTANT AU V. dahliae. 96

III-2-1 Acides aminés 96

III-2-2 Composés phénoliques 96

III-2-2-1 96

III-2-2-2 Recherche du gossypol dans les exsudats 99

III-3 DISCUSSION ET CONCLUSION 100

BIBLIOGRAPHIE 109